

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GERMANA DAVILA DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS NO POTENCIAL ANTIMICROBIANO
DE *Schinus terebinthifolius* (ANACARDIACEAE)

CURITIBA

2013

GERMANA DAVILA DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS NO POTENCIAL ANTIMICROBIANO
DE *Schinus terebinthifolius* (ANACARDIACEAE)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Área de Concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Vania Aparecida Vicente

Co-orientador: Dr^a. Juliana Degenhardt-Goldbach

Dr^a. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Santos, Germana Davila dos
Influência dos fungos endofíticos no potencial antimicrobiano de
Schinus terebinthifolius (Anacardiaceae). / Germana Davila dos Santos. –
Curitiba, 2014.
84 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vania Aparecida Vicente
Co-orientadoras: Juliana Degenhardt-Goldbach
Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia Básica.

1. Aroeira-vermelha 2. Plantas medicinais 3. Fungos I. Título II. Vicente,
Vania Aparecida III. Degenhardt-Goldbach, Juliana IV. Maia, Beatriz Helena
Lameiro de Noronha Sales V. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia Básica.

CDD (20. ed.) 583.28



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“INFLUÊNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS NO POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS*
(ANACARDIACEAE)”**

Por

GERMANA D'ÁVILA DOS SANTOS

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Profª. Drª. Vânia Aparecida Vicente (presidente)


Prof. Dr. José Vicente Teixeira Pinto


Josiane Aparecida Gomes-Figueiredo

Ida Chapaval Pimentel
Membro Suplente

Curitiba, 30 de abril de 2013.

Aos meus pais, Carmen e Elmo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades.

À minha mãe Carmen, pelo amor incondicional e por sempre se fazer presente mesmo quando as atividades de pesquisa me levaram para longe. Sem você nada disso seria possível. Ao meu pai Elmo, por apoiar minhas decisões e compreender minha ausência.

Aos meus tios Ione Maria, Marta, Carlos e Antonio Pedro (*in memoriam*), por fazerem parte da minha história e por tudo que me ensinaram, tenho certeza que de alguma forma estão sempre comigo. À minha tia Eneida e minha prima Zoila, pelo amor e preocupação que sempre me dedicaram. Ao meu tio Enio, pelo carinho que sempre teve por mim.

À minha orientadora e amiga, Vania Aparecida Vicente, pela confiança, os conselhos profissionais e pessoais, as discussões, as palavras de incentivo, as risadas compartilhadas entre nós foram todos passos para construir o meu caminho.

Ao meu namorado Paulo, pela paciência e carinho, principalmente nos meses que antecederam a defesa.

À minha querida amiga e companheira de jornada, Mariana Nascimento, que em todos os momentos dessa caminhada esteve comigo, obrigada de coração pelo teu apoio e amizade. Aos colegas de laboratório que sempre me auxiliaram: Paulo Marangoni, Angela, Mariana Porsani, Rafaela, Carolina, Camila, Mel, João, Joy, Mariana Midory, Monica, Dicler, Renata e Gheniffer. Aos colegas de mestrado e amigos Paulo Camargo e Juciliane. Às alunas de iniciação científica Anna Carolina e Talita, pela importante contribuição neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Patologia Básica por todos os ensinamentos, aos funcionários Vera, Eliana, Evelin e Felipe pela amizade, momentos descontraídos na cozinha e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao amigo Jason, pelo convívio e ajuda.

À secretária da pós-graduação Luciana Marques, pelo auxílio e principalmente pela amizade.

À Embrapa Florestas, pelo apoio técnico, à técnica do Laboratório de Cultura de Tecidos, Janaina, por todo auxílio no laboratório, à minha co-orientadora Dr^a. Juliana pelo auxílio, paciência, incentivo e amizade.

Ao Departamento de Química e à professora Beatriz, pela sua valiosa contribuição nesse trabalho, por sempre me escutar e inclusive ir comigo para o laboratório e me ajudar a encontrar alternativas para conclusão desse trabalho, á aluna Inaiara pela ajuda com CLAE.

À banca de qualificação: Prof. José Vicente e Dr^a Renata, pela contribuição e disposição em ler o material.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela oportunidade.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

"A coisa mais bela que podemos experimentar é **o mistério**. Essa é a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras." **Albert Einstein**.

RESUMO

Schinus terebinthifolius, conhecida popularmente como aroeira, apresenta amplo emprego dentro da medicina popular, devido a sua ação bactericida, antiviral e antitumoral. A aroeira, assim como as plantas em geral, apresenta colonização por micro-organismos endofíticos. A relação dos isolados endofíticos da aroeira com potencial antimicrobiano da planta ainda não está totalmente elucidada. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência dos fungos no potencial dessa planta, através do isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos produtores de substâncias antimicrobianas, bem como a caracterização do potencial antimicrobiano de plantas procedentes de ambiente natural e produzidas sob condições assépticas. A obtenção do extrato metanólico bruto e o isolamento dos micro-organismos endofíticos foram realizados a partir de folhas de *S. terebinthifolius*, localizada no município de Curitiba, Paraná. Para o ensaio de micropropagação, foram retirados segmentos nodais de mudas da mesma árvore, imersos em soluções desinfectantes e introduzidos em meio de cultura apropriado, com diferentes concentrações de fitoreguladores. Um total de 133 fungos foi isolado da planta e a partir de uma seleção macro e micromorfológica, obteve-se 21 grupos, dos quais três apresentaram atividade antimicrobiana para linhagens ATCC de bactérias e leveduras de interesse clínico, através do teste de pareamento. Os fungos selecionados por esse critério foram caracterizados por marcadores moleculares, como *Fusarium* sp, *Xylaria* sp. e *Epicoccum nigrum*. A avaliação do extrato metanólico bruto de planta procedente do ambiente e da cultivada *in vitro* revelou atividade contra as linhagens referências utilizadas. Além disso, as análises realizadas em CLAE sugeriram a presença do composto galato de metila nas frações ativas do extrato bruto da planta procedente do ambiente e a cultivada *in vitro*. Os fungos isolados nesse trabalho parecem não estar relacionados com a produção de galato de metila por essa planta. No entanto, os fungos endofíticos apresentaram atividade antimicrobiana e sendo assim, a caracterização desses compostos representa um caminho para elucidação de substâncias relacionadas à indução e/ou sinergismo na produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas pela planta *S. terebinthifolius*.

Palavras chave: *S. terebinthifolius*, Plantas medicinais, Endofíticos, Micropropagação, Extratos Metanólicos.

ABSTRACT

Schinus terebinthifolius, commonly known as aroeira, is used for its medical properties, for its antibacterial, antiviral and antitumor effects. The aroeira, just like other plants, presents endophytic microorganisms colonization. The link between the isolated endophytic of the aroeira and the antimicrobial potential of the plant is not entirely clear. Taking these observations into account, the objective of the present study was to evaluate the fungi influence on this plant's potential, through the isolation and characterization of endophytic microorganisms that are producers of antimicrobial substances and the characterization of the antimicrobial potential of plants derived from natural environment, produced under aseptic conditions. The attainment of crude methanolic extracts and the isolation of endophytic microorganisms experiments were made with the plant leaves. To test micropropagation, nodal segments were removed from saplings of the same tree, which were immersed in disinfectant solutions and introduced into an appropriate culture with different concentrations of phyto regulators. A total of 133 fungi were isolated from the plant based on a macro and micromorphologic selection, from which 21 groups were obtained. Three of these groups presented antimicrobial activity for ATCC strains of bacterias and yeasts of clinical interest, through pairing) test procedure. The selected fungi for this criterion were characterized by molecular markers, such as *Fusarium* sp, *Xylaria* sp, *Epicoccum nigrum*. The evaluation of the crude methanolic extract resulted from the plant originated from the environment and the *in vitro* cultivation, revealed activity against the referenced strains used in this study. In addition to that, the analysis performed on HPLC, suggest a presence of the same compound in the active fractions of the crude extract from the plant originated from the environment and the *in vitro* cultivation. In conclusion, the fungi isolated in this study seem not be linked to this plant production of methyl gallate. However, the endophytic fungi presented antimicrobial activity. For this reason, the characterization of these compounds represents a path to elucidate the induction of substances-related and/or synergism in the production of metabolites with antimicrobial properties by the plant *S. terebinthifolius*.

Key words: *Schinus terebinthifolius*, Medicinal plants, Endophytic, Micropropagation, Methanolic extracts

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DESCRIÇÃO MACROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE <i>S.terebinthifolius</i>	38
TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebinthifolius</i> , PLANTA LOCALIZADA NO CENTRO POLITÉCNICO DA UFPR, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL	40
TABELA 3 - TESTE DE ANTAGONISMO FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS	41
TABELA 4 - EXPERIMENTO DE ASSEPSIA COM EXPLANTES <i>S. terebinthifolius</i>	42
TABELA 5 - RESULTADOS OBTIDOS DO EXPERIMENTO DE ASSEPSIA COM EXPLANTES DE <i>S. terebinthifolius</i>	42
TABELA 6 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>S. terebinthifolius</i>	43
TABELA 7 - DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE QUATRO PATÓGENOS NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. terebinthifolius</i> E DE SUAS FRAÇÕES AVALIADOS PELO MÉTODO DOS POÇOS (MM)	44
TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE <i>S. terebinthifolius</i> E DE SUAS FRAÇÕES PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO (µg/mL)	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE <i>S.terebinthifolius</i>	17
FIGURA 2 - MACROMORFOLOGIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS A PARTIR DE FOLHAS DE <i>S. terebinthifolius</i> - A-GRUPO1, B- GRUPO2, C-GRUPO3, D-GRUPO4, E-GRUPO5, F-GRUPO6, G-GRUPO 7, H-GRUPO8, I-GRUPO9, J-GRUPO10, K-GRUPO11, L-GRUPO12, M-GRUPO13, N-GRUPO14, O-GRUPO15, P-GRUPO16.....	39
FIGURA 3 - AVALIAÇÃO PELO MÉTODO DE POÇOS DO EXTRATO BRUTO DA PLANTA PRODUZIDA IN VITRO CONTRA LINHAGENS CLÍNICAS DE REFERÊNCIA.	45
FIGURA 4 - CROMATOGRAMA OBTIDO DE PADRÕES PREVIAMENTE ISOLADOS DE <i>S. terebinthifolius</i> POR CERUKS <i>et al.</i> , 2007: A- ÁCIDO GÁLICO; B- CATEQUENA; C- GALATO DE ETILA; D- GALATO DE METILA; E- QUERCITINA.	47
Figura 5 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 4 DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>Schinus terebinthifolius</i>	48
FIGURA 6 - CROMATOGRAFIA DA SOBREPOSIÇÃO DOS PADRÕES DO COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>S. terebinthifolius</i> COM O EXTRATO BRUTO METANÓLICO DAS FOLHAS DA PLANTA CULTIVADA IN VITRO. TEMPO DE RETENÇÃO NA COLUNA DE HPLC 70 MINUTOS.....	48
FIGURA 7 - CROMATOGRAMA DE SOBREPOSIÇÃO ENTRE FRAÇÃO (4) E O EXTRATO BRUTO DA PLANTA CULTIVADA IN VITRO DE <i>S. terebinthifolius</i> (70 MINUTOS).....	49

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

18S - Subunidade ribossomal menor
28S - Subunidade ribossomal maior
ANA - Ácido naftaleno acético
ATCC - American Type Culture Collection
 μL - Microlitro
BAP - Benzilaminopurina ou benziladenina
BDA - Batata Dextrose Ágar
CIA - Clorofórmio Álcool isoamílico
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CTAB - Cetyltrimethylammonium bromide
DAD - Detector de arranjo de diodo
ddNTP - didesoxirribonucleotídeo trifosfato
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA_r - Ácido desoxiribonucléico ribossomal
dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
FeSO₄ - Sulfato de Ferro
HgCl₂ - Cloreto de mercúrio
ITS - Internal transcribed Spacer
KCl - Cloreto de Potássio
KH₂PO₄ - Fosfato de potássio monobásico
mg- Miligramas
MgCl – Cloreto de magnésio
MgSO₄. 7H₂O – Sulfato de magnésio heptahidratado
MH - Mueller Hinton
MIC - Concentração inibitória mínima
NaCl – Cloreto de sódio
NaClO - Hipoclorito de Sódio
NaNO₃ – Nitrato de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NCCLS- National Committee of Clinical Laboratory Standards

nm- Nanometro

pb - Pares de bases

PCR - Polymerase Chain Reaction

PEG - Polietilenoglicol

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

Tris - 2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

UFPR- Universidade Federal do Paraná

ZnSO₄ – Sulfato de Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Atividade biológica e composição química de <i>S. terebinthifolius</i>	16
3.2 Fungos endofíticos.....	19
3.3 Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>S. terebinthifolius</i>	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Material vegetal.....	29
4.2 Isolamento dos micro-organismos endofíticos	29
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos endófitos das folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	30
4.4 Extração de DNA e Sequenciamento.....	31
4.5 Micropropagação de <i>S. terebinthifolius</i>	32
4.6 Obtenção dos extratos	33
4.7 Fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	34
4.8 Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato bruto e das frações dos extratos obtidos.....	34
4.9 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos e frações	36
4.10 - Análise estatística	37
5 RESULTADOS	37
5.1 Isolamento e atividade dos fungos endofíticos de <i>Schinus terebinthifolius</i>	37
5.2 Micropropagação de <i>S. terebinthifolius</i>	41
5.3 Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas de plantas de <i>S.terebinthifolius</i> procedentes do ambiente natural e da cultura de tecido <i>in vitro</i>	43
5.4 Relação química entre os extratos com atividade da planta de procedência ambiental e cultivada <i>in vitro</i>	46
6 DISCUSSÃO	49
6.1 Isolamento e atividade dos fungos endofíticos	49
6.2 Micropropagação de <i>S. terebinthifolius</i>	51
6.3 Atividade dos extratos e frações da planta de ambiente e <i>in vitro</i>	53

6.4 Atividade antimicrobiana dos compostos químicos identificados a partir dos extratos de <i>S. terebinthifolius</i>	55
7 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS.....	58

INTRODUÇÃO

Schinus terebinthifolius Raddi é uma árvore perene, pertence à família Anacardiaceae, nativa da América do Sul, popularmente conhecida como aroeira (FARIZEL, 2008). Essa espécie apresenta amplo emprego dentro da medicina popular, o que permite sua escolha em estudos biológicos, clínicos, farmacológicos e químicos (SOARES, 2010).

Vários estudos fitoquímicos desta espécie já foram realizados e indicaram a produção de compostos como ácidos graxos e terpenóides, principalmente os derivados ácidos 3 α -masticadienóico (schinol) e masticadienóico (JAIN *et al.*, 1995). Os óleos voláteis extraídos dos frutos de *S. terebinthifolius* quando analisados, apresentaram atividade alelopática, citotóxica e tripanocida (SARTORELLI *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2007). Derivados fenólicos como os galatos de metila e etila, além de flavonóides (miricetina, miricetrina e quercitrina) foram isolados do extrato polar das folhas (CERUKS *et al.*, 2007).

Em estudo realizado com extrato foliar dessa planta foi constada a presença de ácido gálico com atividade antitumoral *in vitro* frente a diferentes linhagens celulares (SANTANA *et al.*, 2012). Existem vários estudos a respeito da atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolius*, em que ensaios *in vitro* indicaram que o extrato em etanol das cascas do tronco desta planta e as frações em hexano, clorofórmio e acetato de etila provenientes da partição deste, foram ativos frente a *Staphylococcus aureus* (LIMA *et al.*, 2006) e o extrato aquoso apresentou atividade antifúngica contra a levedura *Candida albicans* (SCHMOURLO *et al.*, 2005). Além disso, em estudo realizado por Johann e colaboradores (2010) foi isolado das partes aéreas da planta dois compostos antifúngicos ativos frente a *Paracoccidioides brasiliensis*, um importante agente de infecções sistêmicas.

A aroeira, assim como as plantas em geral, apresenta colonização por micro-organismos endofíticos, que habitam os espaços intercelulares de plantas, sem causar sintomas de doença visíveis. O termo endofítico se refere apenas aos fungos no momento da detecção, sem levar em conta o estado futuro da interação (BORGES *et al.*, 2009). A relação entre os endofíticos e o

hospedeiro é bastante complexa, pois esses produzem diversas exo-enzimas para facilitar a infecção e colonização do hospedeiro. No entanto, o hospedeiro pode utilizar várias estratégias para se defender, como aumento na atividade das enzimas relevantes, mudanças nas estruturas da parede celular e acúmulo de metabólitos tóxicos (SCHULZ; BOYLE, 2005).

O relato de micro-organismos endofíticos isolados de plantas medicinais é um assunto bastante abordado, sendo que muitos trabalhos estão disponíveis sobre comunidade microbiológica em plantas medicinais (KNEIFEL *et al.*, 2002). Em estudo realizado por Glienke e colaboradores (2012) com micro-organismos endofíticos isolados de plantas reconhecidas no Brasil por suas propriedades medicinais, entre elas a aroeira, *Maytenus ilicifolia*, espinheira santa e *Vochysia divergens*, conhecido como cambará, relatou-se a presença de micro-organismos produtores de compostos químicos com atividade antimicrobiana nestas plantas.

Porém, os estudos sobre plantas associadas a micro-organismos e efeitos da presença dos micro-organismos sobre os metabólitos ativos de plantas medicinais são raros, sendo a contribuição dos endofíticos na variabilidade da produção desses compostos em plantas medicinais pouco explorada. Vários metabólitos são produtos sintetizados e secretados por plantas associadas a micro-organismos, ou pelos endófitos que são fontes promissoras de novas moléculas farmacêuticas (GUTIERREZ *et al.*, 2012). As investigações neste domínio estão aumentando. Os fungos secretam substâncias biologicamente ativas que podem transformar os principais metabólitos das plantas de interesse farmacêutico e assim influenciar na estabilidade desses produtos alterando o valor terapêutico do vegetal (GONDA *et al.*, 2013). Os extratos de plantas utilizados na medicina tradicional podem ter suas atividades influenciadas de grande maneira pelos micro-organismos endofíticos presentes nelas. A questão é se a atividade antimicrobiana da planta é produzida pela própria planta ou é consequência de uma relação mutualista entre micro-organismos benéficos em seus tecidos (RADU; YOKE, 2002).

Na espécie *S. terebinthifolius*, a relação entre fungos endofíticos e a produção de metabólitos pela planta ainda não está totalmente elucidada. No estudo realizado por Tonial (2010), embora não tenha sido encontrada

associação química entre os extratos com atividade antimicrobiana da planta e os extratos dos micro-organismos isolados dela, foi verificada atividade antimicrobiana nos isolados endofíticos. Entretanto é necessário um estudo mais aprofundado, para que seja possível analisar a influência dos fungos endofíticos na produção de metabólitos com atividade antimicrobiana pela planta.

A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido realizada por vários pesquisadores e incrementada nos últimos anos devido a vários fatores, entre eles, dificuldades na reprodução e baixa taxa de germinação ou exploração irracional, resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente, dificultando a coleta de plantas saudáveis (SABÁ *et al.*, 2002). Além disso, a micropropagação de plantas é uma ferramenta importante para análise da atividade dos extratos de plantas produzidas *in vitro* e a influência de fungos endofíticos na produção de metabólitos com atividade pela planta.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência dos fungos no potencial dessa planta através do isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos produtores de substâncias antimicrobianas e caracterizar o potencial antimicrobiano de plantas procedentes de ambiente natural e produzidas sob condições assépticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a influência de fungos endofíticos na produção de metabólitos com atividade antimicrobiana em folhas de *Schinus terebinthifolius*.

2.2 Específicos

- Realizar o isolamento dos endófitos das folhas de aroeira;
- Verificar o potencial antimicrobiano dos diferentes isolados endofíticos obtidos;
- Identificar por meio de marcadores moleculares os gêneros que apresentarem potencial antimicrobiano relevante;
- Produzir plantas de *S. terebinthifolius in vitro*;
- Testar a atividade antimicrobiana das frações do extrato metanólico bruto das folhas da planta de procedência ambiental e a planta produzida *in vitro*;
- Analisar na planta produzida em condições assépticas, a presença de compostos químicos com atividade antimicrobiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) é uma espécie dióica que apresenta ampla distribuição geográfica e plasticidade ecológica (LORENZI, 2002). Essa planta é conhecida popularmente como aroeira-pimenteira e recebe várias denominações, como aroeirinha-vermelha, fruto-de-sabiá e pimenta brasileira. A árvore é perenifólia, heliófita e pioneira, possuindo 5-10 metros de altura, folhas compostas imparipenadas e flores muito pequenas, brancas, agrupadas em panículas axilares e terminais. Os frutos são drupáceos, globóides, vermelhos quando maduro. Aparece desde os estados do nordeste até o Rio Grande do Sul, em várias formações vegetais; em Minas Gerais, muitas vezes forma populações densas (BRANDÃO; LACA-BUENDIA; MACEDO, 2002).

3.1 Atividade biológica e composição química de *S. terebinthifolius*

Na medicina popular, esta planta tem sido usada no tratamento de úlceras, problemas respiratórios, feridas, reumatismo, diarreia, doenças de pele e artrite (MORTON, 1979), bem como antisséptico e anti-inflamatório (MEDEIROS, 2007). Além disso, a decocção de flores, caules, frutos e folhas é indicada para o tratamento de tumores e lepra (SCHMOURLO *et al.*, 2005). O interesse pela espécie se dá pelo seu metabolismo secundário que produz diversos compostos ativos. Os estudos fitoquímicos de *S. terebinthifolius* detectaram a presença de compostos fenólicos simples, flavonóides e taninos, óleos essenciais, esteróides, triterpenos, antraquinonas e saponinas (LIMA *et al.*, 2006).

Derivados fenólicos, tais como os galatos de metila e etila, além de flavonóides (miricetina, miricetrina e quercitrina) foram isolados do extrato polar das folhas de *S. terebinthifolius* (FIGURA 1), cuja ocorrência foi associada à elevada atividade contra radicais livres (CERUKS *et al.*, 2007).

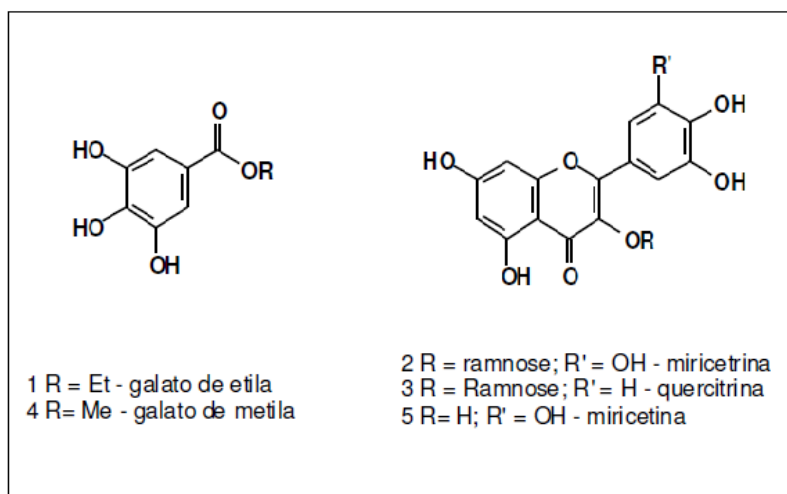


FIGURA 1- COMPOSTOS FENÓLICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *S. terebinthifolius*
FONTE: CERUKS *et al.*, (2007)

Queires e Rodrigues (1998) quantificaram as substâncias fenólicas presente nos órgãos totais de *S. terebinthifolius* com a justificativa de que muitas das atividades desta planta são atribuídas a polifenóis que pertencem a sua constituição estrutural. Os autores observaram uma distribuição irregular dos compostos entre os órgãos da planta, sendo que dentre os órgãos vegetativos, as folhas apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, o que demonstra a importância da utilização da porção correta da árvore para a obtenção de determinada atividade. A utilização da tintura da casca da aroeira é uma alternativa terapêutica eficaz no tratamento da estomatite protética, promovendo remissão dos sinais clínicos e eliminação da infecção por *Candida* sp. (SOARES, 2010).

A análise da atividade antimicrobiana de extratos, aquoso e alcoólico, obtidos de frutos de *S. terebinthifolius* indicou que o extrato alcoólico apresentou efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e de *Bacillus cereus* ATCC 11778, apresentando quantidade significativa da flavona apigenina, além de ácido elágico. O extrato aquoso não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento dos micro-organismos testados (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ; PARDO, 2005).

Em outro estudo, porém verificou-se que o extrato aquoso de *S. terebinthifolius* apresentou atividade contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* e *Candida albicans* (LIMA *et al.*, 2006). Os autores

discutem que esta atividade antibacteriana e antifúngica está, possivelmente, associada à presença de certos compostos químicos, em especial de taninos, além de compostos presentes em menor quantidade, como os alcalóides, esteróides, chalconas e urundeuvinas (LIMA *et al.*, 2006).

Estudos indicaram potencial fungitóxico do extrato obtido de folhas de *S. terebinthifolius* frente ao fungo patógeno de humanos, *Paracoccidioides brasiliensis* (JOHANN *et al.*, 2010). O extrato metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* apresentou atividade antifúngica sobre *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* formando halos de inibição de 15 e 20 mm, respectivamente, além de atividade contra *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* (BRAGA *et al.*, 2007).

Em um estudo para analisar o potencial *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *S. terebinthifolius* contra células tumorais, verificou-se atividade frente a células de melanoma humano (A2058), adenocarcinoma da mama (MCF7), leucemia (HL-60) e carcinoma cervical e foi descrita também pela primeira vez a presença de ácido gálico no extrato ativo de *S. terebinthifolius* com atividade antitumoral (SANTANA *et al.*, 2012). Matsuo e colaboradores (2011) relataram que a substância α -pineno isolada de frutos de *S. terebinthifolius* pode ser um componente importante para a terapia de melanoma, dado o seu elevado potencial de induzir a apoptose em células cancerosas. Em ratos tratados sistemicamente com α -pineno, ocorreu acentuada redução nos nódulos tumorais pulmonares, indicando uma importante atividade contra o melanoma metastático. Queires e colaboradores (2006) comprovaram a atividade antiproliferativa e antitumoral sobre células prostáticas cancerosas da fração de polifenóis do extrato das folhas de *S. terebinthifolius*, provavelmente por estes compostos atuarem em enzimas lisossômicas destas células e, consequentemente, induzirem a apoptose.

Um estudo realizado por Gundidza e colaboradores (2009) com óleos essenciais de *S. terebinthifolius* cultivadas em Zimbábue na África do Sul, encontrou diferenças entre o perfil químico e atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolius* em relação às plantas cultivadas em outras partes do mundo, especialmente no Brasil, onde esta planta é nativa. Este estudo indicou a presença de constituintes como 3-ciclo-hexeno-1-butanol e *trans*- β -ocimeno, que não foram observados nos óleos a partir da planta coletada no Brasil por

BARBOSA e colaboradores (2007). Essas diferenças podem estar relacionadas com as estratégias de defesa contra os agentes patogênicos ou como uma adaptação ecológica a um habitat específico (MAU *et al*, 2003; AGRAWAL, 2007). Gundidza e colaboradores (2009) demonstraram ainda a atividade do óleo essencial de *S. terebinthifolius*, originária de Zimbábuee, contra *E. coli*, *Y. enterocolitica* e *P. aeruginosa*, bem como de atividade moderada contra *C. albicans* e *Aspergillus flavus*.

Em relação ao estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2007), foi relatado que os óleos essenciais de folhas, frutos maduros e imaturos de *S. terebinthifolius* cultivada no Brasil, apresentaram atividade alelopática contra *Lactuca sativa* com taxa de inibição de 88% a 92%. Também foi investigada a atividade citotóxica dos óleos essenciais extraídos dos frutos dessa planta contra células do câncer de mama humano (MCF-7), sendo constatada a atividade dos óleos essenciais de *S. terebinthifolius* contra estas linhagens de células (BENDAOUD, 2010). O composto α -pineno isolado a partir dos óleos essenciais dos frutos de *S. terebinthifolius*, apresentou ação contra o parasita *Trypanosoma cruzi* (SARTORELLI *et al.*, 2012).

3.2 Fungos endofíticos

Estima-se que 1,5 milhões de espécies de fungos estejam presentes no nosso planeta (HAWKSWORTH, 2004). Dentre esses, estão os fungos endofíticos, micro-organismos pertencentes a várias ordens de fungos, que colonizam os tecidos vivos e internos das plantas, de forma intracelular ou extracelular, em uma relação que varia da simbiose à linha limítrofe da patogenicidade (SAIKKONEN *et al.*, 1998). O termo endofítico foi utilizado pela primeira vez em 1866 por Barry (*apud* AZEVEDO, 1997) para designar os micro-organismos que viviam nos tecidos vegetais em caso de infecções assintomáticas ou não e nos casos de interação antagonísticas ou simbióticas.

A relação simbiótica entre a planta e os micro-organismos endofíticos é benéfica para o micro-organismo pela obtenção de proteção e nutrição, em contrapartida, para a planta as substâncias produzidas pelo micro-organismo

podem aumentar o seu crescimento, reprodução e resistência aos fatores de estresse do ambiente (LU *et al.*, 2000; SAIKKONEN *et al.*, 2004). Muitos desses micro-organismos têm importância no processo de adaptação e seleção de várias espécies vegetais, como por exemplo, produzindo substâncias que impedem ataques de insetos, a partir da produção de compostos pelos fungos que desenvolvem na planta, como sabor desagradável ou ainda, favorecem o crescimento em ambientes hostis (CARROLL, 1988). A interação fungo endofítico-planta hospedeira é baseada no equilíbrio entre a virulência do fungo e a defesa da planta. Este equilíbrio é dinâmico e pode ser modificado sob condições de estresse do hospedeiro ou alteração fisiológica nos organismos envolvidos (SCHULZ, 2002; SAIKKONEN *et al.*, 2004).

Recentemente, foi revelado que a interação endofítico-planta pode ir além do equilíbrio entre virulência e defesa, sendo esta interação muito mais complexa e controlada com precisão (KUSARI *et al.*, 2012). Por exemplo, o composto camptotecina, encontrado na casca de *Camptotheca acuminata*, com ação citotóxica e anticancerígena devido à inibição da enzima topoisomerase I, envolvida nos processos de transcrição e replicação do DNA e que se encontra altamente expressa em tumores (KUSARI *et al.*, 2012). O fungo *Fusarium solani* isolado a partir dos tecidos entrecasca de *C. acuminata*, também relatado como produtor de camptotecina, garante sua proteção contra esse composto através de alterações específicas nos domínios catalíticos da sua topoisomerase I (KUSARI *et al.*, 2011a). Da mesma forma, a topoisomerase I codificada por outro endófito isolado a partir do mesmo tecido, mas que não produz camptotecina, também contém as mesmas alterações para torná-lo resistente à ação de camptotecina. Isso sugere que a pré-adaptação evolutiva é semelhante em endófitos que infectam a mesma planta, independentemente da sua capacidade biossintética. (SIRIKANTARAMAS *et al.*, 2009).

A composição de espécies pode variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta e condições ecológicas, incluindo altitude e precipitação. Por exemplo, uma ou duas espécies são predominantes como endofíticas em um dado hospedeiro, enquanto outros isolados são poucos frequentes (CARROLL; CARROL, 1978; ARNOLD *et al.*, 2003). A população de endófitos de uma determinada planta pode variar de acordo com o estado de saúde da mesma, sugerindo que os micro-organismos exerçam

uma provável ação protetora (REITER *et al.*, 2002; YANG; CROWLEY; MENGE, 2001). Um estudo realizado na China verificou que a sazonalidade também interfere na população de endófitos, o isolamento de micro-organismos endofíticos de *Heterosmilax japonica* realizado na primavera gerou maior número de isolados em relação ao isolamento realizado no verão (GAO *et al.*, 2005).

Os fungos endófitos podem regular rotas bioquímicas, levando à produção de substâncias comuns a seus hospedeiros ou vice-versa, que podem ter aplicações fora da planta na qual eles residem (STROBEL, 2002). O primeiro relato foi o isolamento do paclitaxel (taxol®) do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* a partir da planta *Taxus brevifolia*, representante da família Taxaceae (STIERLE *et al.*, 1995). O taxol® ou paclitaxel é um potente agente terapêutico antineoplásico e foi identificado inicialmente em *Taxus brevifolia* (WANI, 1971). Outros exemplos de micro-organismos endofíticos que produziram os mesmos metabólitos que a planta hospedeira podem ser ilustrados pelos fungos *Fusarium* sp. e *Myrothecium* sp. (TRAPP *et al.*, 1998), produtores de tricotecenos macrocíclicos, os quais foram isolados das plantas *Baccharis megapotamica* e *B. coridifolia* (JARVIS *et al.*, 1988; RIZZO *et al.*, 1997). Metabólitos de fungos endofíticos idênticos ao do hospedeiro podem ser ilustrados também pelos compostos anticancerígenos podofilotoxina, obtido a partir do endofítico *Trametes hirsuta*, associado ao hospedeiro *Podophyllum hexandrum* (PURI *et al.*, 2006).

Estudos que relatam a produção de moléculas bioativas por micro-organismos endofíticos, idênticas à produzidas pela planta hospedeira, corroboram a teoria de que durante a colonização da planta hospedeira, esses micro-organismos se adaptam ao microambiente vegetal e assimilam parte do DNA vegetal em seu genoma, constituindo um processo de co-evolução, no qual os endófitos adquirem de seus hospedeiros a capacidade de biossíntese de compostos bioativos (KOUR *et al.*, 2008). Outras teorias assumem que o inverso também é verdadeiro, de modo que parte do DNA microbiano, durante um processo de co-evolução, foi assimilado ao genoma da planta, e o que era uma exclusividade do endófito passa a ser do seu hospedeiro também (PILEGGI *et al.*, 2009).

Os extratos de plantas utilizadas na medicina tradicional podem ter suas atividades influenciadas de grande maneira pelos micro-organismos endofíticos presentes nelas. A questão é se a atividade da planta é produzida pela própria planta ou é consequência de uma relação mutualista entre micro-organismos benéficos em seus tecidos (RADU; YOKE, 2002).

A presença de fungos endofíticos e dos metabólitos produzidos por eles podem modificar a rota metabólica das plantas. Wang e colaboradores (2012) investigaram efeitos do fungo endófito *Gilmaniella* sp. e do metabólito com efeitos elicitor produzido por ele na defesa e respostas metabólicas de plantas hospedeiras *Atractylodes lancea*, a fim de entender como utilizar melhor fungos endofíticos e seus recursos elicitores. Os resultados obtidos indicaram que o eliciador fúngico poderia melhorar substancialmente o teor total de óleo volátil, enquanto o fungo poderia efetivamente melhorar a qualidade dos medicamentos fitoterápicos.

Em estudo realizado por Naik e colaboradores (2008) sobre a diversidade de fungos endofíticos em plantas medicinais arbustivas, realizado com 15 plantas medicinais na região de Malnad, Sul da Índia, foram isolados 6125 fungos endofíticos de 9000 segmentos foliares. Sendo *Alternaria*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phyllosticta* e *Xylaria* os gêneros de fungos mais frequentemente isolados. Ainda, constatou-se que durante o inverno, os fungos eram mais frequentes quando comparados às demais estações, os autores descrevem também que no inverno devido à alta umidade e temperaturas moderadas, os esporos fúngicos podem propagar com mais sucesso. Os autores acrescentam que a alta incidência de espécies do gênero *Cladosporium* e *Penicillium* isolados durante o verão pode estar relacionada à habilidade que os esporos destes fungos apresentam em crescer mesmo em baixos potenciais de água.

O número de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos é maior do que o de qualquer outro micro-organismo. Isso é justificado em parte por ser uma consequência da alta frequência dos vários trabalhos de isolamento de fungos endofíticos de plantas (ZHANG *et al.*, 2006). A descoberta do efeito antibacteriano de um extrato bruto proveniente do meio de cultura ou do micélio de um fungo é a primeira das etapas necessárias para a descoberta de um novo antibiótico. Muitas vezes as substâncias individuais que

compreendem um extrato bruto não possuem atividade antibacteriana relevante quando avaliada individualmente, mas atuam sinergicamente com outras substâncias produzidas pelo micro-organismo (RADIC; STRUKELJ, 2012).

A elucidação e a identificação da estrutura do metabólito com maior atividade são essenciais para o desenvolvimento de um novo antibiótico, com potencial para ser utilizados em terapia (RADIC; STRUKELJ, 2012). Os ácidos xanaltéricos I e II extraídos dos extratos do fungo endofítico *Alternaria* sp., isolado a partir da planta de mangue *Sonneratia alba* coletadas na China, exibiram atividade antimicrobiana ampla contra *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus cloacae*, *Streptococcus pneumonia*, *Candida albicans* e *Aspergillus faecalis* (KJER *et al.*, 2009).

Em um estudo mais recente da atividade antimicrobiana de extratos brutos isolados de fungos endofíticos de mangue, Buatong e colaboradores (2011) testaram um total de 385 extratos de 150 fungos endofíticos com um teste de triagem antimicrobiana. Eles isolaram fungos endofíticos de folhas e ramos de 12 espécies de manguezais (*Aegiceras corniculatum*, *Avicennia alba*, *Avicennia officinalis*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Bruguiera parviflora*, *Lumnitzera littorea*, *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata*, *Sonneratia caseolaris*, *Scyphiphora hydrophyllacea*, *Xylocarpus granatum* e *Xylocarpus moluccensis*) no sul da Tailândia. Os compostos químicos foram isolados a partir da cultura em meio líquido e dos micélios fúngicos e determinada a sua MIC contra bactérias patogênicas humanas. Noventa e dois isolados produziram compostos inibitórios. A maioria dos extratos (28-32%) apresentou ação em *S. aureus*. Somente dois extratos inibiram *P. aeruginosa* (MIC 200 µg/ml) e nenhum dos extratos inibiu *E. coli*. Os extratos fúngicos mais ativos pertenciam aos gêneros *Acremonium*, *Diaporthe*, *Hypoxylon*, *Pestalotiopsis* e *Xylaria*.

Em outro estudo, o endófito *Xylaria* sp. foi isolado a partir de folhas de *Ginkgo biloba* e apresentou ampla atividade antimicrobiana. A partir dos extratos de cultura do fungo, um composto bioativo foi isolado e identificado como 7-amino-4-metilcumarina por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. Esse composto apresentou relevante atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* contra *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Aeromonas hydrophila*,

Yersinia sp., *Vibrio anguillarum*, *Shigella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Candida albicans*, *Penicillium expansum* e *Aspergillus niger* (LIU *et al.*, 2008).

A separação cromatográfica dos extratos das culturas cultivadas do fungo endofítico *Ampelomyces* sp. isolado a partir da planta medicinal *Urospermum picroides*, forneceu 14 produtos naturais que foram identificados com base nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , bem como os espectros de massas e comparação com os dados previamente publicados, dois compostos apresentaram atividade antimicrobiana. O composto 3-O-metilalaternina mostrou atividade com CIM de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ contra *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Enterococcus faecalis*. O composto altersolanol A apresentou um valor de CIM de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ contra *S. epidermidis* e *E. faecalis*, e 25 $\mu\text{g/ml}$ contra *S. aureus* (ALY *et al.*, 2008).

Existem poucos estudos sobre a comunidade endofítica de *S. terebinthifolius*. Strapasson, Santos e Medeiros (2002) isolaram fungos dos gêneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Pestalotia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Nigrospora*, *Goetrichum* e *Mucor* como endofíticos de sementes de aroeira. Lima (2008) isolou das folhas de *S. terebinthifolius* fungos do gênero *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis* e *Phyllosticta*. Tonial (2010), identificou isolados de *Streptomyces*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *P. roseopurpureum*, *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp. e *Trichaptum* sp., como endófitos das folhas. Além disso, Tonial EME colaboradores (2010) relataram que os isolados endófitos de fungos e Actinomycetos das folhas de *S. terebinthifolius* apresentavam potencial para bioprospecção, promovendo inibição do crescimento de pelo menos um dos micro-organismos de interesse clínico testados.

Em estudo realizado com endofíticos isolados de folhas da aroeira foram encontradas três diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* e mostrou grande diversidade genética, incluindo a espécie *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. simmondsii* (LIMA *et al.*, 2012). Gomes e colaboradores (2013) realizaram um trabalho de revisão com fungos do gênero *Diaporthe* provenientes de várias coleções microbiológicas, com objetivo de esclarecer a taxonomia e a filogenia das espécies pertencentes a esse gênero. A espécie *Diaporthe terebinthifolis* foi descrita pela primeira vez nesse estudo, isolada a partir de folhas de *S. terebinthifolius*.

Embora o conhecimento da ecologia e filogenia de micro-organismos endofíticos tenha se acumulado rapidamente durante as últimas décadas, questionamentos sobre a origem evolutiva, especiação e papel ecológico dos endofíticos permanecem largamente sem resposta (SAIKKONEN *et al.*, 2004). Sabe-se que de aproximadamente 300.000 espécies de plantas existentes na terra, cada uma é hospedeira de um ou mais endofíticos, especialmente plantas lenhosas, que podem conter inúmeras espécies com potencial para estudos (SAIKKONEN, 1998; GUO *et al.*, 2008).

3.3 Estabelecimento *in vitro* de *S. terebinthifolius*

O cultivo de plantas *in vitro* ou cultura de tecidos vegetais pode ser definido como o cultivo, em ambiente artificial sob condições assépticas e controladas de células vegetais isoladas, ou tecidos ou órgãos, que podem dar origem a plantas inteiras, diretamente do explante ou indiretamente através de calos. Trata-se de uma biotecnologia, que compreende vários métodos de propagação vegetal em laboratório e, atualmente, vem sendo amplamente utilizada como ferramenta para o estudo do metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis, tais como resistência a pragas e acúmulo de substâncias ativas de interesse comercial (GEORGE, 1993; LAKSHMANA *et al.*, 2005).

A micropropagação é baseada no fenômeno da totipotência das células vegetais, ou seja, cada célula vegetal possui a capacidade de gerar uma nova planta, permitindo a manutenção plena das características da planta-mãe, de modo uniforme, rápido crescimento e matéria-prima homogênea, uma vez que é possível obter várias cópias geneticamente idênticas de um mesmo indivíduo, livre de contaminações (CALDAS *et al.*, 1990).

As principais exigências para um protocolo de micropropagação viável incluem a formulação de meios de cultura simples, poucos procedimentos nas fases de produção, taxas consistentes de propagação, sustentabilidade do sistema em longo prazo e acima de tudo um controle adequado da contaminação, microbiana. Pode-se afirmar que as plantas axênicas são aquelas consideradas livres de todo e qualquer micro-organismo, sendo termo amplamente utilizado na cultura de tecidos (PANICKER *et al.*, 2007).

A propagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido realizada por vários pesquisadores e incrementada nos últimos anos, devido a vários fatores, entre eles, dificuldades na reprodução, baixa taxa de germinação ou exploração irracional, resultando na quase extinção de algumas espécies e modificação do meio ambiente, dificultando a coleta de plantas saudáveis (SABÁ *et al.*, 2002).

Murashige (1962) propôs três diferentes estágios para a micropropagação: Estágio I: seleção de explantes, desinfestação e cultivo destes em meio nutritivo, sob condições assépticas; Estágio II: multiplicação dos propágulos por meio de sucessivos subcultivos em meios de cultura apropriados e; Estágio III: transferência das partes aéreas produzidas para meio de cultura com reguladores de crescimento indutores de raízes e o posterior transplântio das mudas produzidas para substrato ou solo. Um protocolo completo de propagação de plantas consiste em descrever esses três estágios do processo para uma determinada espécie.

A aroeira é uma espécie lenhosa, que geralmente apresenta elevada variabilidade no comportamento *in vitro*, o que faz com que seja necessário escolher condições de cultivo para cada espécie e para os diferentes genótipos. Portanto, a escolha adequada do meio nutritivo, bem como dos reguladores de crescimento constituem etapas relevantes nesse processo. De maneira geral, utiliza-se um meio básico composto de macro e micronutrientes, vitaminas, inositol, fonte de açúcar (geralmente sacarose), e eventualmente outros compostos orgânicos (como aminoácidos) e outras substâncias quimicamente indefinidas (como água de coco e extrato de malte) e, também, reguladores de crescimento. Os meios nutritivos comumente usados com espécies florestais são o MS de Murashige e Skoog (1962), cuja formulação foi desenvolvida, inicialmente para tecido medular de *Nicotiana tabacum* e o WPM ("Woody Plant Medium") elaborado por Lloyd e McCown (1981) para a propagação de plantas lenhosas.

A dificuldade de obter tecidos livres de contaminações provocadas por fungos e bactérias e ainda, por oxidações causadas pela liberação de compostos fenólicos, é um dos maiores entraves no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas (THORPE *et al.*, 1991; GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). As contaminações provocadas por fungos e bactérias podem ser evitadas ou minimizadas com a manutenção da planta-matriz, doadora de

explante em casa-de-vegetação, situação que favorece a aplicação e ação de fungicidas e bactericidas (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Os micro-organismos contaminantes competem com os explantes pelos nutrientes do meio de cultura e provocam danos diretos e indiretos pela colonização de seus tecidos, podendo eliminar no meio, metabólitos tóxicos às plantas (MONTARROYOS, 2000). Os agentes desinfestantes comumente utilizados na cultura de tecidos para a assepsia de segmentos nodais e gemas apicais incluem o etanol, hipoclorito de cálcio, hipoclorito de sódio e cloreto de mercúrio (HARTMANN *et al.*, 1990; VASSIL; THORPE, 1994).

A desinfestação de segmentos nodais em espécies lenhosas é a primeira etapa a ser considerada para a realização de um ótimo estabelecimento *in vitro* (PIERIK, 1990). Os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes usadas como fonte de explantes são provenientes do campo. No entanto, mesmo as plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação são fontes potenciais de micro-organismos, que podem tornar-se limitantes aos procedimentos de cultivo *in vitro* (MEDEIROS, 1999).

A oxidação dos explantes é outro obstáculo a ser vencido no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas. Esta ocorre devido ao corte que danifica as células dos tecidos, promovendo a liberação de compostos fenólicos precursores da síntese de lignina, os quais modificam a composição do meio de cultivo e a absorção de metabólitos, podendo levar à morte dos tecidos (ANDRADE *et al.*, 2000). Para evitar ou minimizar estes fatores, os pré-tratamentos aplicados às plantas doadoras de explantes são determinantes no processo de estabelecimento *in vitro*.

A oxidação fenólica ocorre devido à presença da enzima polifenol oxidase nos plastídeos da célula vegetal que atua oxidando substâncias precursoras da síntese de lignina, acarretando na liberação de substâncias tóxicas no meio de cultura que inibem o desenvolvimento do explante, (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Vários tratamentos ou pré-tratamentos podem ser utilizados com a finalidade de atenuar o problema de oxidação fenólica. Dentre eles, os compostos antioxidantes mais comuns adicionados ao meio de cultura são cisteína, ácido ascórbico, glutathione, polivinilpirrolidona (PVP) ou substâncias como carvão ativado, que adsorve os fenóis e seus

produtos de oxidação, evitando que os mesmos afetem o crescimento do explante (ALENCAR, 1999).

Os fitorreguladores se destacam como os principais controladores da morfogênese *in vitro*. Dentre as citocininas, o BAP (6- benzilaminopurina) tem sido muito eficaz para promover a multiplicação em diversas espécies e parece ser a citocinina mais adequada para a multiplicação de parte aérea e indução de gemas adventícias. Contudo, em algumas culturas, podem-se obter brotações pequenas, inadequadas para serem individualizadas para o enraizamento. Neste caso, necessita-se de uma fase de alongamento, sendo as giberelinas os principais reguladores vegetais utilizados com esta finalidade (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A indução de raízes em brotos micropropagados, permite a composição de uma planta completa e de sua posterior transferência para o ambiente *ex-vitro*. Segundo Alencar (1999), o processo de enraizamento consiste em duas fases distintas, porém contínua: a indução e o alongamento. Na fase de indução, comumente se utiliza meio nutritivo contendo uma maior concentração de auxinas enquanto que na segunda fase, este fitorregulador deve estar presente em baixas concentrações ou ausente. Entretanto, o processo de enraizamento em plantas lenhosas é mais complexo do que em herbáceas, principalmente quando se utiliza explantes oriundos de plantas adultas, pois os seus tecidos estão bastante especializados (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Em trabalhos de cultura de tecidos, o tratamento de brotos com auxinas sintéticas como AIB e ANA estimula a formação de raízes (GASPAR; COUMANS, 1987; citado por ALENCAR, 1999). A diluição dos sais do meio de cultura pode aumentar a eficiência do processo de enraizamento, já que a sua alta concentração tende a inibir a formação dessas estruturas. Porém, o broto pode ter o seu desenvolvimento interrompido e consequente morte em meios de cultura que apresentem baixa concentração de macronutrientes (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

Durante ensaios para cultivo *in vitro* da aroeira da praia, observou-se que o explante mais indicado é o segmento nodal. Os segmentos internodais desenvolvem apenas calos, não havendo indução de brotos adventícios. O

tratamento com 4,5 μ M de BAP foi mais responsivo para a regeneração de *S. terebinthifolius* (PAIVA; ALOUFA, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

O desenvolvimento dos métodos descritos abaixo foi realizado a partir de folhas e sementes coletadas da espécime de *Schinus terebinthifolius* localizada no *Campus* Politécnico da Universidade Federal do Paraná, mais precisamente, à latitude 25° 26.827S, longitude 49° 13.997O e altitude de 940m (GPS Ashtech Promark 2), de acordo com o Departamento de Geomática, Curso de Engenharia Cartográfica da UFPR. A identificação botânica da planta foi realizada no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR (UPCB) pelo Prof. Dr. Olavo Araújo Guimarães. O herbário possui uma exsicata da planta sob o registro: UPCB-30848.

4.2 Isolamento dos micro-organismos endofíticos

A metodologia utilizada para o isolamento dos micro-organismos endofíticos foi a descrita por Petrini (1991) com algumas modificações estabelecidas por LIMA, 2008. Dois isolamentos foram realizados nos meses de setembro de 2011 e março de 2012. Para o isolamento, foram coletadas amostras de 240 folhas com pecíolos, da espécime vegetal localizada no *Campus* Politécnico da Universidade Federal do Paraná, acondicionadas em sacos plásticos etiquetados e levadas ao laboratório. Para desinfestação da superfície do material, a fim de se eliminarem os micro-organismos epifíticos, as folhas foram lavadas em água corrente. Os pecíolos foram parafinados para evitar a entrada de solução esterilizante nos tecidos internos das folhas, desta forma preservando os endofíticos. Em seguida, as folhas foram imersas em água destilada esterilizada por 1 minuto, etanol 70% por 1 minuto, hipoclorito

de sódio (NaOCl) a 3%, por 4 minutos, novamente lavadas em etanol 70% por 30 segundos e por último em água destilada esterilizada por 6 minutos.

As folhas foram cortadas, em condições de assepsia, em fragmentos de aproximadamente 0,5 x 0,5cm, utilizando-se um bisturi esterilizado, os quais foram transferidos para placas de Petri com diferentes meios de cultura (Meio Agar Batata Dextrose, com tetraciclina a 50 µg/mL para fungos e ágar seletivo para actinomicetos). Então, as placas foram incubadas a 28°C por 20 dias, sendo o crescimento verificado diariamente para o repique dos micro-organismos que se desenvolveram. Para o cálculo da frequência de isolamento foi usada uma relação de 100% para o número de fragmentos semeados. As coletas foram realizadas nos meses de setembro de 2011 e março de 2012.

As culturas foram armazenadas permanentemente na coleção de fungos do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Patologia Básica (LABMICRO-UFPR), Paraná, Brasil.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos endófitos das folhas de *S. terebinthifolius*

Primeiramente foi realizada uma seleção macromorfológica, na qual apenas um exemplar de cada morfologia de colônia foi mantido para os ensaios. Em seguida foi realizado um ensaio de pareamento dos micro-organismos previamente selecionados pela macromorfologia contra micro-organismos de interesse clínico *Staphylococcus aureus* (ATCC 27213), *Escherichia coli* (ATCC 35219), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Para isso, os isolados de fungos foram incubados em BDA por sete a quatorze dias, dependendo da taxa de crescimento do micro-organismo, a 28°C. Com o auxílio de um vazador de rolhas, foram retirados cilindros de ágar com o crescimento de 6 mm de diâmetro das bordas das colônias. Os cilindros foram transferidos para placas de Petri contendo uma camada de 15 mL de Ágar Mueller-Hinton.

Cada placa recebeu cinco fragmentos, sendo um controle negativo composto apenas de BDA, um controle positivo com antibiótico e os outros três com fragmentos de diferentes endófitos. Após a distribuição destes fragmentos na placa, os mesmos foram envolvidos vertendo-se uma camada de Ágar

Mueller-Hinton fundido, contendo o inóculo. Para o preparo do meio com o inóculo, inicialmente foi feita uma suspensão bacteriana na concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL (escala MacFarland nº0,5) e uma suspensão leveduriforme, com aproximadamente 10^6 UFC/mL (escala MacFarland nº0,5), em caldo Mueller-Hinton a partir de uma cultura de 24 horas do micro-organismo. Então, 100 µL de uma destas suspensões foi adicionada em 15 mL de Ágar Mueller-Hinton fundido em uma temperatura próxima aos 45°C e homogeneizado.

As placas contendo os cilindros dos endófitos e o meio com inóculo solidificado, foram incubadas em aerobiose a 35°C por 24 a 48 horas, para bactérias e levedura respectivamente. Para a análise dos resultados foi investigada a presença de halos de inibição do crescimento bacteriano e leveduriforme. Como controles da viabilidade do inóculo, foram utilizadas placas apenas com a linhagem referência (MARIANO, 1993).

4.4 Extração de DNA e Sequenciamento

A metodologia para extração dos isolados fúngicos foi a estabelecida por Vicente *et al.*, (2008). Aproximadamente 1 cm² de micélio dos isolados cultivados em BDA, foi transferido para microtubos de PCR volume de 1,5mL contendo tampão CTAB e uma mistura de sílica em pó (sílica gel/celite 2:1). O material foi triturado e adicionado clorofórmio, obtendo-se fases. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo e acrescentado etanol, para a precipitação do DNA. Após a precipitação do DNA, foi procedida a lavagem com álcool 70% gelado. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (260nm) e sua integridade verificada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio.

As regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do gene DNA ribossomal foram amplificados com os pares de oligonucleotídeos iniciadores V9G (5'-TTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3') e LS266 (5'-GCATTCCCAAACAACCTCGACTC-3') (GERRITS VAN DEN ENDE; DE HOOG 1999) utilizando as condições de reações baseadas em Vicente *et al.*, (2008), seguindo um ciclo de 94°C por 2 minutos, trinta ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e para finalizar um ciclo 72 °C

por 3 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados e quantificados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (1000pb *Ludwing Biotec*). Na reação de sequenciamento, foram utilizados os “primers” ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC--3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3-') (WHITE *et al.*, 1990). realizado em sequenciador ABI3130.

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD *et al.*, 2002). As sequências foram comparadas com sequências de linhagens referência depositadas no banco de dados NCBI - National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para a detecção de similaridade entre as sequências.

4.5 Micropropagação de *S. terebinthifolius*

A micropropagação de aroeira (*S. terebinthifolius*) foi baseada na metodologia estabelecida por PAIVA e ALOUFA (2009). Os frutos foram coletados de espécimes de *S. terebinthifolius* encontrados no *Campus Politécnico* da Universidade Federal do Paraná e as sementes foram germinadas em condições de casa de vegetação, onde foi mantido um banco de germoplasma.

Após a germinação, explantes (que consistiram de segmentos nodais, com aproximadamente 1 a 1,5 cm de comprimento) foram coletadas de regiões meristemáticas e imergidos em uma solução a 0,5% de ácido cítrico e ácido ascórbico para transporte e em seguida realizada a desinfecção por meio de diferentes soluções.

Posteriormente, os segmentos nodais foram submersos por um minuto em álcool 70% e desinfestados em câmara de fluxo laminar, submetendo-as aos tratamentos de assepsia, considerando: A1- solução de hipoclorito de sódio com taxa de cloro ativo a 2% por 10 minutos (PAIVA; ALOUFA, 2009); A2- cloreto de mercúrio 0,05% por 5 minutos; A3- cloreto de mercúrio 0,1% por 5 minutos; A4 cloreto de mercúrio 0,05% por 10 minutos; A5- cloreto de

mercúrio 0,1% por 10 minutos; A6- cloreto de mercúrio 0,01% por 5 minutos; A7- cloreto de mercúrio 0,01% por 10 minutos. Após a desinfestação, os mesmos foram lavados 3 vezes com água destilada autoclavada.

Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e após cada tratamento de assepsia, foram inoculadas 1 segmento em cada tubo de ensaio esterilizado contendo 10 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), o pH ajustado para 5,8, com 2 repetições, sendo 50 explantes por assepsia. O fotoperíodo aproximado foi de 16 horas de luz, fornecida por lâmpadas fluorescentes e temperatura em torno de $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Os meios nutritivos testados foram MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3% de sacarose, 0,1 g/L de mio-inositol, 7,0 g/L de ágar e WPM (LLOYD; MCCOWN, 1980) com 20 % de sacarose, 0,1g/L mio-inositol, 7,0 g/L-1 de ágar submetidos aos seguintes tratamentos: T1- MS, 4,4 μM BAP; T2-WPM, 4,4 μM BAP; T3-MS, 4,4 μM BAP+0,1 μM ANA e T4-WPM+4,4 μM BAP+0,1 μM ANA.

Os meios foram distribuídos em alíquotas de 10 ml por tubo e esterilizados a 121°C , sob pressão de 1 atm, durante 20 minutos. Em cada frasco foi inoculado 1 segmento em cada frasco, com 2 repetições, 50 explantes por tratamento. Após os 7 dias de inoculação, foram avaliados semanalmente a porcentagem de brotações, oxidação e contaminação (fungos e bactérias).

4.6 Obtenção dos extratos

As folhas jovens de *S. terebinthifolius* foram coletadas, lavadas em água corrente e colocadas em estufa com temperatura inferior a 40°C para secagem, posteriormente trituradas, pesadas e transferidas para *erlenmeyers* contendo éter de petróleo com o dobro do volume ocupado pelas folhas. A renovação do solvente foi realizada em intervalos de 24 horas durante três dias. O extrato foi filtrado em papel filtro, com o auxílio de um funil de vidro acoplado a frascos esterilizados. Após esse processo, as folhas foram extraídas com metanol, do mesmo modo descrito acima. Os extratos de éter

de petróleo e metanólico foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e o resíduo vegetal desprezado (HARBORNE, 1998).

4.7 Fracionamento do extrato bruto metanólico das folhas de *Schinus terebinthifolius*

O extrato bruto metanólico concentrado foi fracionado através de uma coluna de cromatografia a vácuo utilizando gradiente de solventes para eluição. Para o fracionamento, aproximadamente 10 g do extrato metanólico bruto concentrado foram incorporados numa mistura de 2 g de sílica-gel e 2 g de florisil. Esta mistura foi colocada sobre 156 g da mistura de sílica-gel e florisil (1:1) na coluna a vácuo. Em seguida, um volume de 300 ml de cada eluente foi vertido sobre a camada de sílica, em ordem crescente de polaridade na seguinte sequência: éter de petróleo, éter de petróleo: acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1) e metanol. Cada fração foi recolhida separadamente em um balão de vidro e concentrada em evaporador rotativo (HARBORNE, 1998).

4.8 Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato bruto e das frações dos extratos obtidos

A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos obtidos foi feita por dois métodos. O Método dos poços (adaptação do manual M2-A8 padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2003 e o Método da microdiluição (adaptação do manual padronizado pela CLSI M7-A6, 2003; Gold standart para a verificação de atividade antimicrobiana):

- Método dos poços

Em placas de Petri contendo 30 mL de ágar Mueller-Hinton, foram feitos quatro orifícios de 6 mm de diâmetro, sendo um para o controle negativo (etanol 30%), um para o controle positivo (cloranfenicol 8,0 mg/mL para bactérias e nistatina 100000 UI/mL para leveduras), um como controle do solvente do extrato/frações (dimetilsulfóxido) e outro para o(a) extrato/fração a

ser analisado(a). Após a confecção dos orifícios, a superfície do meio de cultura teve o inóculo semeado com o auxílio de um *swab*. Os inóculos apresentaram concentração de 10^8 UFC/mL para as linhagens referência de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e 10^6 UFC/mL para a linhagem referência de *Candida albicans*, ambas previamente cultivadas em aerobiose em meio Mueller-Hinton por 24 horas. Para ajuste da concentração de inóculo, foi usada como base uma escala MacFarland nº 0,5. Em seguida, 50 µL de extrato/fração e dos controles foram pipetados nos orifícios previamente confeccionados, as placas foram incubadas sem inverter, a 35°C, por 24 horas para as bactérias e 48 horas para a levedura. Os resultados foram coletados através da medida do halo de inibição de crescimento do crescimento formado em volta do poço. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata.

- Microdiluição

O teste foi realizado em microplacas esterilizadas de 96 orifícios, de fundo plano, com tampa. Foi utilizado caldo MH como meio de cultura. O extrato metanólico bruto da planta procedente de ambiental e da cultivada *in vitro* e frações do extrato bruto da planta de procedência ambiental com atividade verificada pelo método de poços foram preparados como solução estoque, na concentração de 100.000 µg/mL, utilizando o solvente DMSO. Os 96 orifícios da microplaca foram preenchidos com 90 µL de meio líquido (caldo MH). Cada linha foi preenchida com uma concentração do extrato, para isso foram preparadas a partir da solução estoque, outras soluções de maneira que quando adicionado 100 µL dessa solução no orifício fosse obtido uma concentração de 1000 µg/mL na primeira linha, 900 µg/mL até a concentração de 100 µg/mL, com intervalos de 100 µg/mL. Foram reservados orifícios para controle, sendo: uma linha para o controle do meio de cultura; a segunda para o controle de crescimento bacteriano; aos orifícios de outra linha foram adicionados 100 µL de gentamicina, na concentração de 0,2 mg/mL, para o controle positivo para bactérias e Nistatina 1000 UI para *C. albicans*; no orifícios das linhas de A a H da coluna 10, foram adicionados 100 µL do solvente utilizado para o preparo da solução estoque, para o controle negativo. As diluições seriadas foram distribuídas de forma que as concentrações finais

na microplaca para as amostras vegetais foram de 1000 até 100 µg/mL, com intervalos de 100. Sequencialmente, foram adicionados 20 µL da suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) aos orifícios das colunas. O experimento foi realizado em triplicata. Posteriormente, as microplacas foram levadas à estufa incubadora à 37 °C, durante 24 horas.

Ao término da incubação, as microplacas foram submetidas à leitura em leitor de microplacas a 595 nm, onde tiveram seus valores registrados para a avaliação da MIC.

4.9 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos e frações

As análises do extrato bruto e frações da planta de ambiente e do extrato bruto da planta produzida *in vitro* foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters acoplado a um detector DAD, utilizando a coluna X-Terra C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm). Os solventes foram previamente filtrados em membrana PTFE 47 mm 0,45µm (Maxcrom OEM) e então desgaseificados em banho ultrassônico por 10 min. A coluna foi mantida à temperatura de 30°C. As eluições foram realizadas utilizando-se Metanol e água num fluxo de 0,8 mL/min, em modo gradiente (5:95 a 100:0; MeOH:H₂O), com injeção de 10 µL. O tempo de corrida foi de 70 min.

Para melhor resolução dos picos no cromatograma do extrato das folhas de ambiente, utilizou-se a técnica de Clean-up SPE. Para esta técnica foram solubilizados 411,5 mg do extrato das folhas em 5 ml de MeOH (grau CLAE). Usou-se um cartucho Sep Pak de RP-18 (500 mg-6 ml), 55µm Strata-E, Phenomenex® e o cartucho foi acoplado ao manifold e condicionado com 5 mL de MeOH e 5 mL de H₂O ultrapura. Foram feitas eluições de 6 mL cada, com o seguinte gradiente, MeOH:H₂O 0:100;20:80; 40:60; 60:40, 80:20, 100:0, sendo feito a coleta de cada eluição.

4.10 - Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância – ANOVA - com um delineamento inteiramente casualizado (DIC). As análises foram realizadas em todas as etapas necessárias do trabalho. Sempre que foi encontrado um valor significativo em relação ao teste F, completou-se a análise com teste de Tukey para comparação das médias, utilizando-se software ASSISTAT (FRANCISCO; SILVA, 2009).

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e atividade dos fungos endofíticos de *Schinus terebinthifolius*

Um total de 133 fungos endofíticos foi isolado das folhas da planta *S. terebinthifolius* localizada no *Campus* Politécnico da Universidade Federal do Paraná. Durante o isolamento, observou-se um maior número de fungos isolados no mês de setembro de 2011, somando um total de 79% em relação ao mês de março de 2012, onde foi obtido 56% de frequência de isolados. Os fungos foram inicialmente agrupados de acordo com as suas características macromorfológicas, cujos critérios adotados foram sumarizados na Tabela1, obtendo-se assim, grupos morfológicos de isolados (FIGURA 2).

TABELA 1 - MACROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *S.terebinthifolius*

GRUPOS	MACROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE <i>S.terebinthifolius</i>
1	Micélio felpudo, de coloração inicial branca, reverso escuro com o tempo e taxa rápida de crescimento.
2	Micélio felpudo, coloração branca e taxa de crescimento rápida.
3	Micélio algodonoso, coloração branca, bordas irregulares, produção de estruturas aéreas, taxa de crescimento rápido.
4	Micélio compacto, com bordos irregulares, coloração verde escura; taxa de crescimento lenta.
5	Micélio algodonoso, coloração branca, taxa de crescimento rápido,
6	Micélio aveludado, coloração branca; taxa de crescimento rápido
7	Micélio algodonoso, coloração amarela; taxa de crescimento rápido
8	Micélio compacto, verso branco, reverso verde escuro, produção de estruturas áreas, crescimento lento.
9	Micélio algodonoso, coloração branca, com formação raios, taxa de crescimento rápido
10	Micélio compacto, coloração salmão, produção de pigmento
11	Micélio algodonoso, coloração verde clara ; taxa de crescimento rápido
12	Micélio compacto, coloração branca,bordas regulares, crescimento lento
13	Micélio compacto, coloração branca,bordas irregulares, crescimento lento
14	Micélio pulverulento colônias de coloração verde e aspecto
15	Micélio compacto, coloração branca,bordas regulares, crescimento lento, produção de pigmento verde
16	Micélio compacto, com bordos irregulares, coloração alaranjada e branca; produção de pigmento, taxa de crescimento lento

FONTE: O AUTOR (2013)

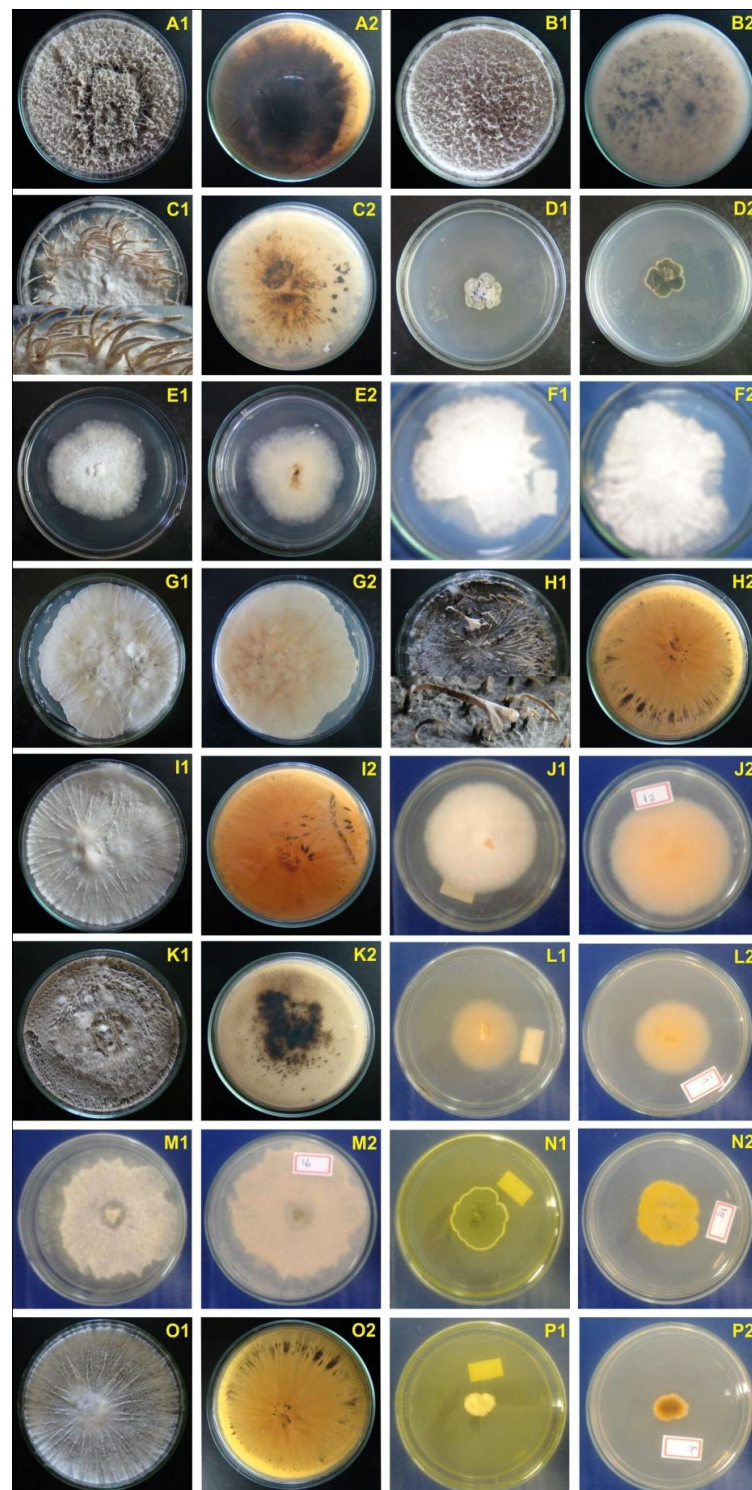


FIGURA 2- MACROMORFOLOGIA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS A PARTIR DE FOLHAS DE *S. terebinthifolius* - A1-2 (GRUPO1: *Diaporthe* sp.) , B1-2 (GRUPO-2: *Diaporthe terebinthifolii*) , C1-2 (GRUPO3: *Acremonium* sp.), D1-2-(GRUPO4: *Guignardia* sp.), E1-2 (GRUPO5: *Mycelia sterilia*), F1-2 (GRUPO6: *Glomerella* sp.), G1-2 (GRUPO 7: *Bipolares* sp.), H1-2 (GRUPO 8: *Alternaria* sp.), I1-2-(GRUPO 9: *Anthostomella leucospermi*), J1-2(GRUPO10; *Fusarium equiseti*), K1-2 (GRUPO11: *Nigrospora* sp.), L1-2 (GRUPO12: *Colletotrichum* sp.), M- (GRUPO 13: *Ulocladium* sp.), N1-2 (GRUPO 14: *Penicillium commune*), O1-2 (GRUPO15: *Xylaria* sp.), P1-2 (GRUPO 16: *Epicoccum* sp.).

Os isolados de cada grupo foram identificados preliminarmente a partir da macromorfologia, onde foram identificados 21 grupos. Um representante de cada grupo morfológico foi escolhido para avaliação do potencial antimicrobiano frente a linhagens referência de bactérias e leveduras de interesse clínico e caracterizados por meio do sequenciamento das regiões ITS1, do gene DNAr. A partir do sequenciamento foram confirmados 16 grupos de fungos endofíticos isolados a partir das folhas de *S. terebinthifolius* e os resultados foram sumarizados na tabela 2. Alguns isolados ainda estão em fase de identificação e os resultados podem ser encontrados de forma detalhada na tabela 1 do anexo I.

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DAS FOLHAS DE *Schinus terebinthifolius*, PLANTA LOCALIZADA NO CENTRO POLITÉCNICO da UFPR, CURITIBA, PARANÁ, BRASIL

Grupos	Número de isolados	Identificação Morfológica	Identificação Molecular	Gene sequenciado/ Nº de acesso genebank
1	29	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Diaporthe</i> sp.	ITS/KF025946
2	10	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	ITS/ KF025947
3	11	<i>Acremonium</i> sp.	NI	-
4	18	<i>Guignardia</i> sp.	<i>Guignardia vaccinii</i>	ITS/KF025945
5	6	<i>Mycelia sterilia</i>	NI	-
6	2	<i>Glomerella</i> sp.	NI	-
7	4	<i>Bipolares</i> sp.	NI	-
8	6	<i>Alternaria</i> sp.	NI	-
9	5	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp	ITS/KF025950
10	7	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp	ITS/KF025952
11	4	<i>Nigrospora</i> sp.	<i>Nigrospora</i> sp.	ITS/KF025949
12	8	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	ITS/KF025948
13	5	<i>Ulocladium</i> sp.	NI	-
14	3	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium commune</i>	ITS/KF025951
15	13	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	ITS/KF025953
16	2	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>	ITS/KF025954

NI- NÃO IDENTIFICADO (SEQUENCIAMENTO EM ANDAMENTO)

FONTE: O AUTOR (2013)

Dos 21 isolados endofíticos avaliados quanto ao potencial antimicrobiano pelo teste de pareamento (Item 4.3, metodologia), um total de três foi selecionado quanto ao potencial avaliado. O fungo

Fusarium sp., com nove isolados, apresentou atividade contra *S. aureus* enquanto, o isolado *Xylaria* sp. (12 isolados) foi ativo contra as linhagens referência de *E. coli* e *S. aureus* e o fungo *Epicoccum nigrum*, 2 isolados, demonstrou atividade frente às linhagens referência das bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Nenhum dos isolados testados apresentou atividade contra *C. albicans* (TABELA 3).

TABELA 3 - TESTE DE ANTAGONISMO FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

Endófito	DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO ENDÓFITO X MICRO-ORGANISMO(mm)			
	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Fusarium equiseti</i>	-	-	14 e 15	-
<i>Xylaria</i> sp	-	12 e 10	13 e 12	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	17 e 18	X	16 e 14	-

FONTE: O AUTOR (2013)

- = AUSÊNCIA DE HALO

5.2 Micropropagação de *S. terebinthifolius*

Para a introdução *in vitro* dos segmentos nodais de apicais de plantas adultas de *S. terebinthifolius*, inicialmente foi adotado o protocolo de desinfecção, utilizando hipoclorito de sódio (item 4.5). Os resultados iniciais indicaram uma alta frequência de contaminação seguida de oxidação. Então, foi adotado para a desinfecção, o composto químico cloreto de mercúrio, utilizado em diferentes concentrações e períodos de exposição (5.2). A partir do período de incubação (entre 7 a 14 dias) observou-se oxidação em praticamente todos os tratamentos. Embora esta oxidação tenha sido observada, a assepsia realizada com cloreto de mercúrio apresentou melhores resultados, no que se refere à oxidação e contaminação, quando comparada com a realizada com hipoclorito de sódio (TABELA 4).

Baseado no percentual de contaminação dos segmentos nodais, durante o estabelecimento *in vitro* de *S. terebinthifolius*, verificou-se nas plantas submetidas ao tratamento com o cloreto de mercúrio as menores percentagens de oxidação e maiores taxas de sobrevivência. Sendo a concentração de 0,01% por 10 minutos o melhor tempo de exposição (Tabela3). E portanto, este

foi o protocolo de assepsia adotado para a realização da introdução dos segmentos nodais.

TABELA 4 - EXPERIMENTO DE ASSEPSIA COM EXPLANTES DE *S. terebinthifolius*

Tratamento Assepsia	Contaminação (%)	Oxidação(%)	Brotamento (número)
NaClO 2% por 10 minutos	34	30	03
HgCl ₂ 0,05% por 5 minutos	26	30	18
HgCl ₂ 0,1% por 5 minutos	24	45	09
HgCl ₂ 0,05% por 10 minutos	12	62	12
HgCl ₂ 0,1% por 10 minutos	12	66	04
HgCl ₂ 0,01% por 5 minutos	52	24	14
HgCl ₂ 0,01% por 10 minutos	38	14	20

FONTE: O AUTOR (2013)

Depois de estabelecida a melhor assepsia, foram realizados experimentos para avaliação do melhor meio e concentração de fitoreguladores para introdução em *in vitro* da planta *S. terebinthifolius*. Os resultados obtidos sugerem que o meio WPM (4,4 µM BAP, 0,1 µM ANA e 7 g/L Agar), foi o melhor para introdução (TABELA 5).

TABELA 5- RESULTADOS OBTIDOS DO EXPERIMENTO DE ASSEPSIA COM EXPLANTES *S. terebinthifolius*

Tratamentos	Contaminação(%)	Oxidação(%)	Brotamento (número)
T1- MS, 4,4µM BAP	4	52	17
T2- WPM, 4,4µM	24	24	15
T3- MS, 4,4µM BAP, 0,1 µM ANA	10	42	17
T4- WPM, 4,4 µM BAP, 0,1 µM ANA	16	18	30

FONTE: O AUTOR (2013)

A partir desses experimentos, em torno de 1000 segmentos foram introduzidos *in vitro*, das quais 40 plantas se desenvolveram sob controle de contaminação. Os repiques para novos meios de cultura eram realizados a cada quinze dias, nesse período também foram realizados testes com a introdução de carvão ativado e polivinilpirrolidone compostos frequentemente utilizados para reduzir a presença de substâncias oxidantes no meio de cultura.

No entanto, a presença desses compostos não resultou na diminuição das taxas de oxidação nos explantes.

Após um período de oito meses ocorreu a formação de raízes em seis plantas, de forma espontânea, ou seja, sem adição de compostos indutores da formação de raízes. As seis plantas que apresentaram raízes foram transferidas para vidros esterilizados com terra autoclavada adicionada de aditivos para a indução de crescimento. Entretanto, essas plantas não se adaptaram a essa condição e entraram em senescência.

O restante das plantas (em torno de 34 explantes) foi destinado para obtenção do extrato metanólico bruto (item 4.6) com a finalidade de verificar a natureza química e atividade antimicrobiana dos compostos presentes no extrato da planta produzida *in vitro*. Além disso, folhas destas plantas foram utilizadas para a realização de isolamento de micro-organismos endofíticos. Fragmentos foliares dos explantes foram cultivados durante o período de vinte dias. Os resultados indicaram a ausência de micro-organismos dentro do período analisado.

5.3 Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas de plantas de *S. terebinthifolius* procedentes do ambiente natural e da cultura de tecido *in vitro*

A partir das folhas de *S. terebinthifolius* procedente do ambiente foram obtidos 35,02 g de extrato metanólico bruto e da planta produzida *in vitro* 0,197 g de extrato bruto metanólico, o que significa um rendimento de 17,51% da planta procedente do ambiente e 19% da planta produzida *in vitro* em relação ao peso seco das folhas utilizadas.

O extrato bruto da planta proveniente de ambiente foi fracionado, obtendo-se os seguintes rendimentos das frações: 0,002 g, éter de petróleo (1); 0,34 g, éter de petróleo: acetato de etila (2); 0,04 g, acetato de etila (3); 3,2 g, acetato de etila: metanol (4) e 0,84, metanol (5). Esses resultados foram sumarizados na Tabela 6.

TABELA 6 RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *S. terebinthifolius*

Fração	Peso(g)	Rendimento(%)
Éter de petróleo	0,002	0,02
Éter de petróleo: acetato de etila	0,34	3,4
Acetato de etila	0,04	0,4
Acetato de etila:metanol	3,2	32
Metanol	0,84	8,4

FONTE: O AUTOR (2012)

Um estudo preliminar da ação dos extratos brutos metanólicos de folhas de *S. terebinthifolius*, das frações obtidas do extrato bruto de procedência ambiental e do extrato bruto da planta *in vitro* foi realizado por meio do método de poços (Item 4.8).

De acordo com os resultados obtidos verificou-se que tanto o extrato bruto metanólico das folhas de *S. terebinthifolius* de procedência ambiental quanto as cultivadas *in vitro* possuíam compostos ativos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. As frações de extrato da planta de procedência ambiental que apresentaram atividade antimicrobiana mais relevante foram acetato de etila:metanol (1:1) e a metanol, sendo que a fração acetato de etila: metanol apresentou halos de inibição maiores (TABELA 7).

TABELA 7- DIÂMETRO DO HALO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE QUATRO PATÓGENOS NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO DE *S. terebinthifolius* E DE SUAS FRAÇÕES AVALIADOS PELO MÉTODO DOS POÇOS (MM)

Tratamento	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato Bruto	20 e 25	17 e 16	30 e 31	20 e 2,2
Éter de petróleo: acetato de etila	-	-	-	-
Acetato de etila	10 e 12	8 e 7	-	-
Acetato de etila:metanol	25 e 27	38 e 39	20 e 20	19 e 21
Metanol	12 e 14	18 e 22	12 e 15	12 e 14
Planta <i>in vitro</i>	23 e 24	29 e 30 e	32 e 35	24 e 26

FONTE: O AUTOR (2012)

- = AUSÊNCIA DE HALO DE INIBIÇÃO

O extrato metanólico bruto da planta produzida *in vitro* apresentou atividade contra as linhagens patogênicas avaliadas, com diâmetro de halos de

inibição semelhantes aos do extrato bruto metanólico da planta procedente do ambiente (FIGURA 03).

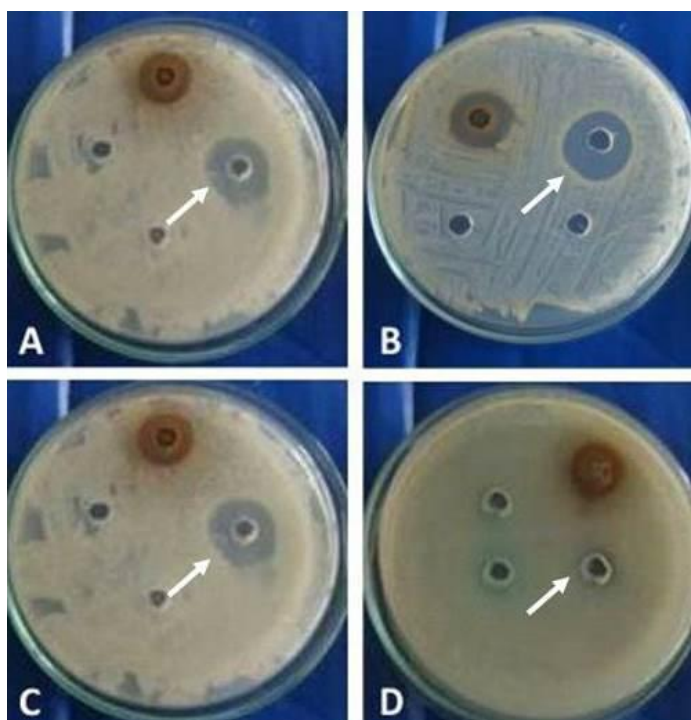


FIGURA 3- AVALIAÇÃO PELO MÉTODO DE POÇOS DO EXTRATO BRUTO DA PLANTA PRODUZIDA *in vitro* CONTRA LINHAGENS CLÍNICAS DE REFERÊNCIA. A - *C. albicans* (ATCC 10231), B - *S. aureus* (ATCC 27213), C - *E. coli* (ATCC 35219) E D - *P. aeruginosa* (ATCC 27853). O HALO DE COLORAÇÃO MARROM OBSERVADO NAS PLACAS É RESULTANTE DO POÇO CONTENDO O EXTRATO BRUTO. AS SETAS INDICAM O CONTROLE POSITIVO MOSTRANDO O HALO DE INIBIÇÃO NO POÇO CONTENDO OS ANTIMICROBIANOS GENTAMICINA PARA BACTÉRIAS E NISTATINA PARA LEVEDURAS. FONTE: O AUTOR(2013)

Após a avaliação da atividade dos extratos pela metodologia de poços, os extratos e frações que apresentaram atividade antimicrobiana foram selecionados para verificação da concentração inibitória mínima (MIC) frente aos mesmos micro-organismos previamente testados, através de testes de diluição em microplacas, realizados conforme descritos na metodologia (ITEM 4.8).

No total, foram avaliados o extrato bruto da planta de procedência ambiental e cultivada *in vitro* e as frações acetato de etila:metanol (4) e metanol (5) dos extratos da planta de procedência ambiental.

O extrato obtido com o solvente acetato de etila: metanol (4) apresentou melhor resultado frente às bactérias testadas, com uma concentração inibitória mínima de 500 µg/mL para *E. coli*, 600 µg/mL para *P. aeruginosa* e 300 µg/mL

para *S. aureus*. O extrato bruto de planta cultivada *in vitro* também apresentou ação antimicrobiana frente aos micro-organismos testados, onde verificou-se inibição de *E. coli* (MIC= 500 µg/mL), *P. aeruginosa* (MIC= 700 µg/mL) e *S. aureus* (MIC=400 µg/mL). Nenhum extrato apresentou atividade contra *C. albicans* nas concentrações testadas por este método (TABELA 8).

TABELA 8- AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE *S. terebinthifolius* E DE SUAS FRAÇÕES PELO MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO (µg/mL)

Tratamento	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Extrato Bruto	800	900	400	-
Éter de petróleo:	-	-	-	-
acetato de etila	-	-	-	-
Acetato de etila	-	-	-	-
Acetato de etila:metanol	500	600	300	-
Metanol	-	-	400	-
Planta <i>in vitro</i>	500	700	400	-

FONTE: O AUTOR (2013)

- NÃO APRESENTOU ATIVIDADE

5.4 Relação química entre os extratos com atividade da planta de procedência ambiental e cultivada *in vitro*

Para análise em CLAE dos compostos, inicialmente foram injetados os padrões isolados e identificados de compostos obtidos de *S. terebinthifolius* (cedidos pelo professor João Lago - USP) para serem utilizados como parâmetro. Os cromatogramas obtidos a partir dos padrões estão representados na Figura 4.

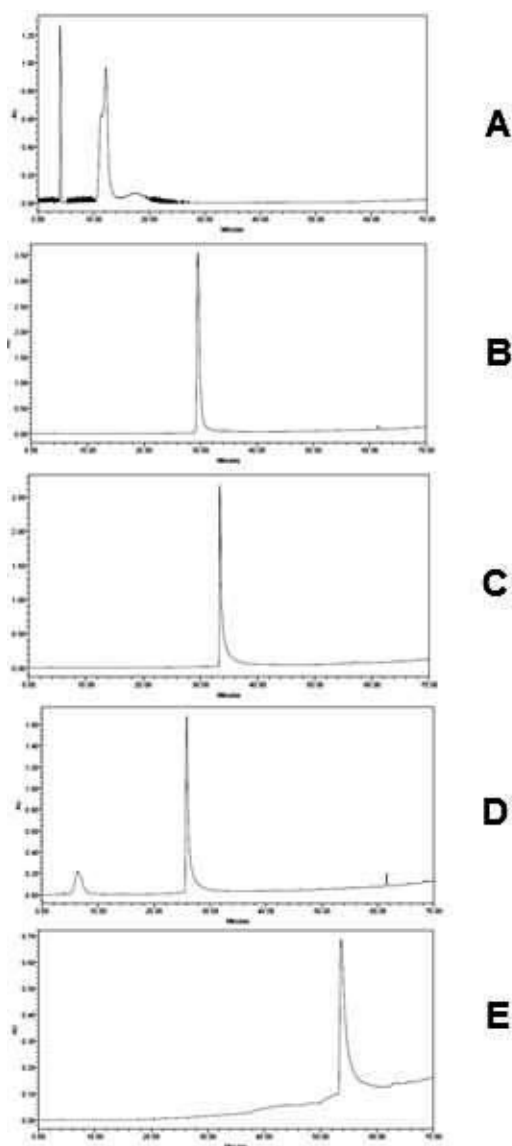


FIGURA 4- CROMATOGRAMA OBTIDO PADRÕES PREVIAMENTE ISOLADOS DE *S. terebinthifolius* POR CERUKS *ET AL.*, 2007: A- ÁCIDO GÁLICO; B- CATEQUINA; C- GALATO DE ETILA; D- GALATO DE METILA; E- QUERCITINA.

Após a obtenção do perfil cromatográfico dos padrões, foram realizados as análises do extrato metanólico e suas frações, das folhas da planta procedente do ambiente. Para as plantas cultivadas *in vitro* foi analisado apenas o extrato bruto metanólico das folhas.

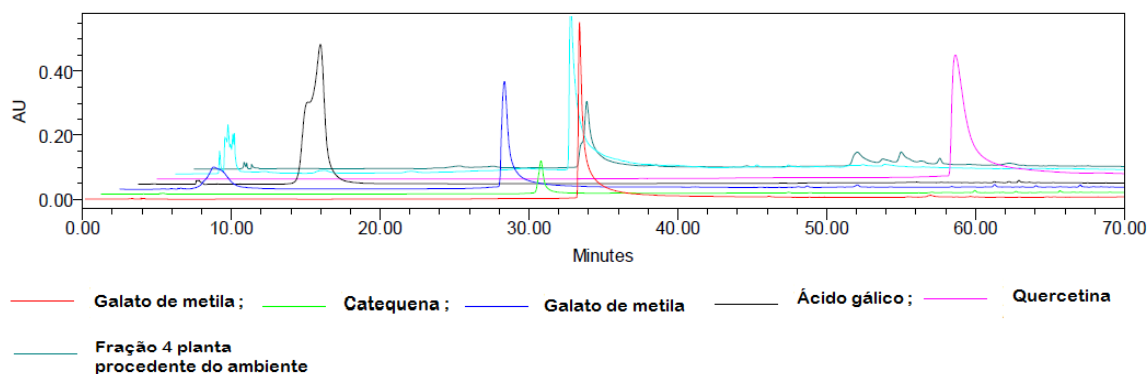
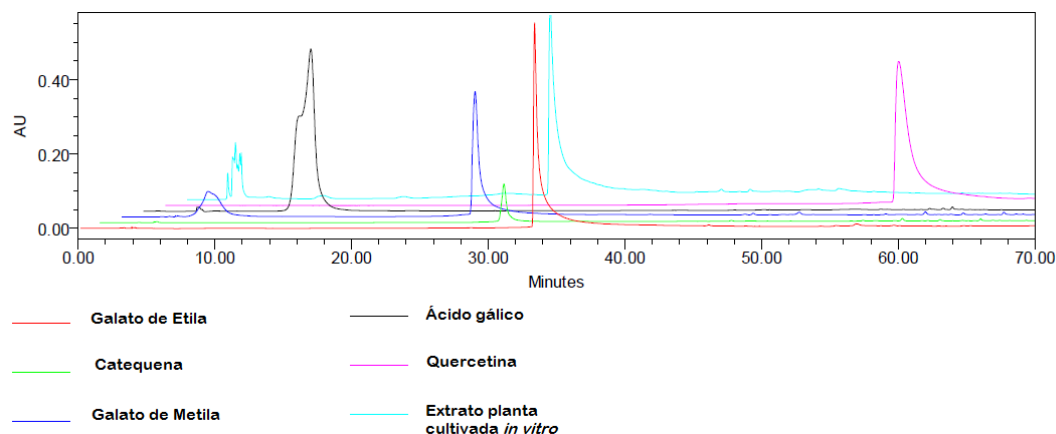


FIGURA 5-PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO 4 DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Schinus terebinthifolius*

Através da comparação entre o perfil cromatográfico dos padrões de *S. terebinthifolius* (FIGURA 4) com o extrato bruto das folhas da planta de procedência ambiental, não foi possível identificar os compostos, devido à presença de ruídos. Nas frações do extrato, foi possível identificar a presença do galato de metila na fração 4 de acetato:metanol (FIGURA 5). O perfil cromatográfico do extrato bruto das folhas da planta cultivada *in vitro* apresentou tempo de retenção semelhante ao padrão galato de metila (FIGURA 6).

FIGURA 6- CROMATOGRAFIA DA SOBREPOSIÇÃO DOS PADRÕES DOS COMPOSTOS



ISOLADOS DE *S. terebinthifolius* COM O EXTRATO BRUTO METANOLICO DAS FOLHAS DA PLANTA CULTIVADA *IN VITRO*. TEMPO DE RETENÇÃO NA COLUNA DE HPLC 70 MINUTOS

Comparando os padrões de cromatografia do extrato das folhas da planta procedente do ambiente e das plantas cultivadas *in vitro*, foi possível demonstrar que a fração 4 (acetato de etila: metanol) obtida pelo fracionamento

do extrato bruto da planta de procedência ambiental apresentou um padrão cromatográfico similar ao apresentado pelo extrato bruto da planta cultivada *in vitro* (FIGURA 7).

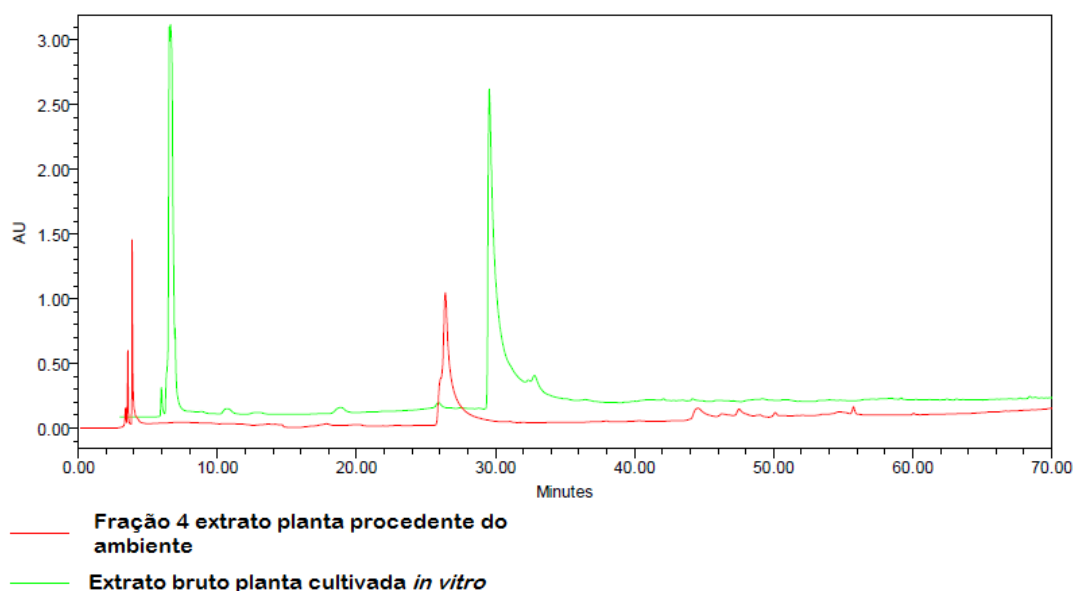


FIGURA 7- CROMATOGRAMA DE SOBREPOSIÇÃO ENTRE FRAÇÃO (4) E O EXTRATO BRUTO DA PLANTA CULTIVADA IN VITRO DE *S. terebinthifolius* (70 MINUTOS).

6 DISCUSSÃO

6.1 Isolamento e atividade dos fungos endofíticos

Os isolamentos de fungos endofíticos foram realizados em dois diferentes períodos sazonais, primavera (Setembro de 2011) e verão (Março de 2012). A frequência dos fungos endofíticos isolados na primavera foi maior, 79%, em relação ao verão 56%. Outros trabalhos realizados com a mesma planta, apresentaram dados semelhantes aos observados nesse trabalho, Tonial (2010) no mês de setembro obteve 76% de frequência de isolamento e em março 50%. Da mesma forma, Gao e colaboradores (2005) obtiveram uma frequência maior de isolados endofíticos de *Heterosmilax japonica*, uma planta medicinal amplamente utilizada na cultura chinesa, durante a primavera. Tais

resultados sugerem uma variação sazonal para os endófitos, o que deve ser levado em consideração para estudos de variabilidade populacional.

Nesse estudo foram identificados diversos isolados fúngicos endófitos das folhas de aroeira, pertencentes a diferentes gêneros e espécies *Diaporthe* sp, *Diaporthe terebinthifolii*, *Guignardia vaccinii*, *Anthostomella leucospermi*, *Fusarium equiseti*, *Nigrospora* sp, *Colletotrichum* sp, *Penicillium commune* e *Epicoccum nigrum* (TABELA 1). Entre os isolados, o gênero *Diaporthe* foi o mais frequente, inclusive com o registro da espécie *D. terebinthifolii*, a qual representa uma espécie nova, descrita recentemente por Gomes e colaboradores(2013) e foi isolada a partir de folhas da mesma planta.

O fungo *Guignardia vaccinii* isolado no presente trabalho já foi relatado como endofítico da planta *Garcinia parvifolia* no estudo realizado por Sim e colaboradores (2010). Esse fungo apresentava atividade antimicrobiana frente à *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus megaterium* e *B. subtilis*. Entretanto, não foi verificada atividade antimicrobiana desse fungo contra as linhagens patogênicas utilizadas como referência no presente estudo.

O gênero *Colletotrichum* isolado com grande frequência neste estudo (TABELA1), já foi relatado como endofítico de *S. terebinthifolius* no trabalho realizado por Tonial (2010). Além disso, em outro estudo com endofíticos isolados de folhas dessa planta foram encontradas três diferentes espécies de *Colletotrichum* com grande diversidade genética, incluindo a espécie *C. gloeosporioides*, *C. boninense* e *C. simmondsii* (LIMA *et al.*, 2012). Esses achados parecem indicar que as espécies do gênero *Colletotrichum* são fungos endofíticos frequentes em *S. terebinthifolius*.

Entre os diferentes isolados, três pertencentes a gêneros diferentes *Fusarium equiseti*, *Xylaria* sp. e *Epicoccum nigrum* apresentaram alta atividade antimicrobiana. De acordo com relatos da literatura, estes gêneros foram isolados como endofíticos de várias espécies de plantas (RADIC; STRUKELJ, 2012). O fungo *F. equiseti* apresentou atividade contra *S. aureus*. Este fungo foi anteriormente relatado como endofítico de plantas medicinais, nativas de outras regiões, cujos isolados apresentavam atividade antimicrobiana contra esse micro-organismo. Em um estudo realizado com isolados endofíticos de *G. parvifolia*, uma planta pertence à família Clusiaceae, nativa da Ásia, Austrália, África do Sul, e Polinésia, amplamente utilizada na Malásia, pela

população como anti-inflamatório, foi identificada como *F. equiseti* e apresentava atividade contra *S. aureus*, *Agromyces lapidis*, *L. monocytogenes*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* (SIM *et al.*, 2010).

Outro fungo endofítico obtido durante este isolamento, identificado como *Xylaria* sp., apresentou atividade antimicrobiana frente a *E.coli* e *S. aureus*. Este fungo tem sido relatado como endófito de *Ginkgo biloba* e produtor de muitos compostos biologicamente ativos, incluindo agentes antifúngicos (LIU *et al.*, 2008). Ainda de acordo com os autores, o fungo também mostrou expressiva atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia* sp., *Vibrio anguillarum*, *Shigella* sp. e *Vibrio parahaemolyticus*, com MICs obtidos comparáveis ou mesmo menores do que os obtidos para os antibióticos de controle positivo ampicilina, gentamicina ou tetraciclina. Hu e colaboradores (2010) relataram a ocorrência de *Xylaria* sp. como endófito de *Torreya jackii*, uma planta medicinal também originária da China, com isolados produtores de novos compostos que inibiram o crescimento de *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus*.

Além disso, neste trabalho foi observado dois isolados de *Epicoccum nigrum* com atividade antimicrobiana. Baute e colaboradores (1978), também obtiveram um isolado de *E. nigrum* que inibia o desenvolvimento de *S.aureus*. Outro trabalho realizado com extrato bruto etanólico de *E. nigrum* isolado como endofítico de *Dendrobium devonianum*, uma planta medicinal da família Orchidaceae, relatou atividade antagonista do extrato desse fungo contra *S. aureus* com um espectro superior ao do antibiótico Ampicilina.(JUAN *et al.*, 2011). Além disso Zhang e colaboradores (2007) obtiveram epicoccins, um derivado de *E. nigrum* com atividade contra *B. subtilis*.

A avaliação do potencial antimicrobiano dos isolados endofíticos de *S. terebinthifolius* realizado por Tonial (2010) selecionou os fungos *Phomopsis* sp., *Alternaria* sp. e *Penicillium roseopurpureum*, ativos in vitro contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. e o actinomiceto (*Streptomyces* sp.) com atividade contra *C. albicans*. Esses resultados diferem dos encontrados no presente trabalho e sugerem uma variação na população de micro-organismos endofíticos isolados de *S. terebinthifolius*.

6.2 Micropropagação de *S. terebinthifolius*

A micropropagação *in vitro* de plantas medicinais tem sido realizada por vários pesquisadores (SABÁ *et al.*, 2002; PANICKER *et al.*, 2007). Nesse trabalho, a micropropagação representou uma ferramenta de suma importância para avaliação do papel dos fungos endofíticos no potencial antimicrobiano de *S. terebinthifolius*.

A assepsia, segundo Debergh e colaboradores (1992) é o primeiro estágio da micropropagação. A porcentagem de explantes contaminados nesta etapa reflete a dificuldade na obtenção de material. Primeiramente para o estabelecimento de *S. terebinthifolius* foi utilizado o protocolo estabelecido por Paiva e Aloufa (2009), o qual utilizava etanol a 70% por 3 minutos, hipoclorito de sódio com taxa de cloro ativo a 2% por 10 minutos, possibilitando a obtenção de 86% de taxa de indução de brotos. Entretanto, utilizando o mesmo tratamento no presente trabalho, foram obtidas taxas de brotamento muito baixas. Como uma alternativa para assepsia de *S. terebinthifolius*, foram realizados experimentos utilizando o cloreto de mercúrio em diferentes concentrações e tempo de imersão para assepsia, sendo a concentração de 0,01% por 10 minutos, a melhor assepsia. A utilização de cloreto de mercúrio vem sendo empregada em ensaios para o estabelecimento *in vitro* de várias espécies como uma alternativa para desinfestação de explantes e sementes, onde a contaminação por micro-organismos é um fator limitante (FERMINO *et al.*, 2009).

No presente trabalho, o cloreto de mercúrio não atuou negativamente sobre o brotamento de explantes. Os resultados desse estudo podem ser comparados com os de Ribas e colaboradores (2005) com segmentos nodais de peroba-rosa. Os autores avaliaram hipoclorito de sódio 0,25% e cloreto de mercúrio 0,05% por 10 minutos e obtiveram melhor taxa de sobrevivência dos explantes na assepsia com cloreto de mercúrio. Contudo, segundo George (1993), apesar do cloreto de mercúrio ser mais eficiente do que o hipoclorito de sódio na desinfestação de explantes, ele é um produto tóxico e deve ser usado com muita cautela, tanto para evitar a fitotoxidez quanto para o contato humano.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, em relação aos meios avaliados, o WPM foi o meio de cultura mais adequado, com taxa de 60% de indução de brotos, enquanto o meio MS apresentou taxas de 34%. A

substituição do meio MS basal pelo meio WPM, foi baseada em relatos da literatura, devido composição mais diluída em nutrientes do meio WPM, originalmente formulado para espécies lenhosas (MELO *et al.*, 1999). De acordo com Pasqual (2001) o meio WPM possui 25% das concentrações de íons nitrato e amônia, quando comparado ao meio MS. No entanto, o meio WPM apresenta mais potássio e um elevado nível de íons sulfato, sendo o mais indicado para espécies lenhosas como é o caso da aroeira.

Em todos os experimentos realizados, a partir do décimo quinto dia foi observado alto nível de oxidação fenólica, que dificultou e impediu o desenvolvimento dos explantes. O mesmo foi observado por Das e colaboradores (1996) no cultivo de cajueiro, que a partir do 15-20 dias ocorreu o escurecimento e a morte dos explantes. Segundo Paiva e Aloufa (2009) a oxidação fenólica é um dos problemas que dificulta o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro* para algumas espécies, ocorrendo a liberação de compostos fenólicos devido à injúria causada nos tecidos durante a excisão dos explantes.

A partir desses experimentos, 40 plantas foram introduzidas em *in vitro*, sob controle de contaminação, com repiques a cada quinze dias. Essas plantas foram utilizadas para obtenção de extratos, utilizando o mesmo método de extração adotado para a obtenção dos extratos da planta procedente do ambiente. As propriedades antimicrobianas e a presença de compostos químicos dos extratos procedentes da planta do ambiente natural e *in vitro* e dos endofíticos foram determinadas com o objetivo de avaliar a influência dos fungos endofíticos na propriedade antimicrobiana da planta *S. terebinthifolius*. Além disso, folhas da planta cultivada sob controle de assepsia, foram submetidas ao mesmo método (ITEM 4.2) da planta procedente do ambiente para isolamento de endofíticos, para assegurar a ausência de fungos endofíticos na planta produzida *in vitro*, não sendo verificado o crescimento de nenhum micro-organismo nesse experimento.

6.3 Atividade dos extratos e frações da planta de ambiente e *in vitro*

Em relação à partição do extrato, os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos encontrados por Tonial (2010) e Boros (2008) quando trabalharam com a mesma planta, sendo que a maioria dos metabólitos secundários obtidos do extrato metanólico bruto das folhas foram concentrados na fração acetato de etila: metanol (1:1), dado coerente levando em consideração a polaridade do solvente utilizado para a extração.

Com base na metodologia de difusão em poços, foi verificada atividade contra todos os micro-organismos testados para o extrato metanólico bruto de aroeira de procedência ambiental e da cultivada *in vitro*. Esses dados sugerem a presença de compostos com atividade antimicrobiana na planta cultivada *in vitro*. Os resultados obtidos por esse métodos foram utilizados para indicar presença ou ausência de atividade do(s) extrato/frações. A atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolius* já foi relatada em vários estudos utilizando esse método. Resultados semelhantes foram encontrados por LIMA e colaboradores (2004), com extrato aquoso de caules e folhas da aroeira que expressou atividade contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus cereus* e *P. aeruginosa*.

Outros estudos, utilizando a mesma metodologia, confirmaram a atividade de compostos polares obtidos a partir de *S. terebinthifolius* contra *S. aureus* (SOARES; MENTZ, 2006). Também já foi confirmada, por metodologia de mesmo princípio, a atividade do extrato alcoólico dos frutos de aroeira contra *S. aureus* (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY; PARDO, 2005). Entretanto o presente trabalho é o primeiro a avaliar essa atividade em plantas de *S. terebinthifolius* cultivadas *in vitro*.

A fração do extrato bruto da planta de procedência ambiental que apresentou atividade contra todos os micro-organismos analisados, foi acetato de etila:metanol. Esta metodologia utilizada apenas forneceu dados para que fossem geradas hipóteses para os resultados da microdiluição, que é a metodologia *gold standart* para a avaliação de atividade antimicrobiana, de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

O ensaio de microdiluição confirmou a atividade do extrato bruto metanólico da planta procedente do ambiente e da cultivada *in vitro*. A fração do extrato da planta procedente do ambiente que melhor concentrou os metabólitos ativos foi a de acetato de etila:metanol (1:1). Esses resultados

indicam que os compostos ativos seriam de polaridade alta, possivelmente do grupo dos polifenóis (taninos, flavonóides, quinonas).

O resultado mais expressivo foi obtido contra a bactéria *S. aureus*, o extrato bruto da planta de procedência ambiental e a cultivada *in vitro* apresentaram valores de MIC 400 µg/mL e de 300 µg/mL para fração acetato de etila:metanol da planta de procedente do ambiente, em trabalho realizado por Moura-costa e colaboradores (2012) a MIC indicada para *S. aureus* foi de 250 µg/ mL.

A caracterização dos compostos produzidos pelos fungos endofíticos poderá elucidar melhor a influência da comunidade endofítica na produção desses compostos pela planta.

6.4 Atividade antimicrobiana dos compostos químicos identificados a partir dos extratos de *S. terebinthifolius*

Diante dos cromatogramas CLAE/DAD obtidos a partir dos extratos brutos da planta do ambiente e da planta cultivada *in vitro* assim como das frações ativas da planta de ambiente de *S. terebinthifolius*, observou-se picos, semelhantes ao padrão galato de metila. O galato de metila foi anteriormente isolado a partir de folhas de *S. terebinthifolius*, com atividade antiradicalar e propriedades antialérgicas (CAVALHER-MACHADO *et al.*, 2008; CERUKS *et al.*, 2007a). Além disso, este composto tem sido isolado de outras plantas medicinais, com ação antibacteriana comprovada.

Em um estudo realizado por Kang e colaboradores (2008) relatou-se que esse composto promoveu a inibição da aderência *in vitro* de *S. mutans*. Gorzalczany e colaboradores (2011) realizaram estudos com camundongos e verificaram que o galato de metila isolado da planta *Lithrea molleoides*, apresentava ação anti-inflamatória sistêmica. Uma avaliação da atividade antimicrobiana de galato de metila isolado de *Paeonia lactiflora* contra isolados clínicos de *Helicobacter pylori* indicou que esse composto possui potencial antibacteriano para a prevenção de doenças causadas por *H. pylori*. (THI *et al.*, 2012). Esses estudos corroboram os

resultados obtidos para *S. terebinthifolius* no presente trabalho, sugerindo a presença do galato de metila tanto nas frações com maior atividade antimicrobiana, acetato de etila:metanol (1:1) e metanol como no extrato bruto das folhas da planta produzida *in vitro*.

A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto de aroeira demonstrou a inibição de bactérias e leveduras pelo método da microdiluição em placas. Entretanto, não foi possível constatar a atividade antifúngica frente à levedura *C. albicans* por meio da concentração inibitória mínima (MIC) do extrato bruto e das frações. O fato de não ter sido confirmada atividade antifúngica pelo método MIC pode estar relacionado à concentração testada de até 1000 µg/mL. Schmourlo e colaboradores (2005) estudaram a atividade antimicrobiana de *S. terebinthifolius* verificando que o extrato aquoso perdia a atividade anteriormente identificada contra *C. albicans* quando fracionado. Resultados similares foram obtidos por Boros (2008), sugerindo que diferentes frações podem estar associadas e assim promoverem a atividade de forma sinérgica.

7 CONCLUSÕES

Por meio dos resultados deste estudo verificou-se que alguns fungos endofíticos isolados de *S. terebinthifolius* possuem atividade antimicrobiana, com potencial para bioprospecção.

A caracterização dos extratos de folhas da planta de procedência ambiental e daquelas produzidas *in vitro* com atividade antimicrobiana, indicou a presença de galato de metila no extrato de ambas as plantas.

Os fungos isolados nessa pesquisa parecem não estar relacionados com a produção de galato de metila por essa planta.

Como perspectivas futuras, este trabalho propõe a padronização de um protocolo *in vitro* de *S. terebinthifolius*, o qual possibilitará a realização de experimentos de infecção *in vitro*, utilizando micro-organismos endofíticos

previamente isolados desta planta. Além disso, a purificação e caracterização química de compostos com atividade antimicrobiana produzidas pelos fungos endofíticos de *S. terebinthifolius*, também possibilitarão a realização de experimentos para avaliar a atividade desses compostos na planta produzida *in vitro* e desta forma abrir janelas para o entendimento dos mecanismos envolvidos na produção das substâncias antimicrobianas pela planta e a sua relação com os micro-organismos endofíticos.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. A. Macroevolution of plant defense strategies. **Trends. Ecol. Evol.** v. 22, p. 103-109, 2007.
- ALENCAR, A. P. **Estabelecimento do cultivo *in vitro* do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr.).** 87 p. Dissertação – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1999.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p. 3389- 3402, 1997.
- ALY, A. H.; EDRADA-EBEL, R.; WRAY, V. *et al.* Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp . isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1716–1725, 2008.
- ANDRADE, M. W. *et al.* Micropropagação da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.1, p.174-180, 2000.
- ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 15649–15654, 2003
- AZEVEDO, J.L. Fungos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v1, p.12-15, 1997
- BACON, C. W.; WHITE, J. F. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. **Microbial Endophytes**, p. 237–261, 2000.
- BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; PAULA, V. F. DE; ISMAIL, F. M. D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* RADDI. **Química Nova**, v.30, n.8, p. 1959–1965, 2007.
- BAUTE, M. A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A. New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*. **The Journal of Antibiotics**, v.31, n.11, p.1099–1101, 1978.
- BENDAOUD, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. **Journal of Food Science**, v.75, n.6, p.466–72, 2010.

BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHEN, Y.; STADEN, R. **The Staden Package Manual**. Editora: Copyright, 2002.

BORGES, W. D. S.; BORGES, K. B.; BONATO, P. S.; SAID, S.; PUPO, M. T. Endophytic Fungi : Natural Products , Enzymes and Biotransformation Reactions. **Current Organic Chemistry**, v.13, p.1137–1163, 2009.

BOROS, L. F. **Ação Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico de Folhas da *Schinus Terebinthifolius* Raddi (Aroeira)**. Dissertação de Mestrado o (Microbiologia, Parasitologia e Patologia) Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, 2008.

BRAGA, F. G.; MARIA, L.; BOUZADA, M. *et al.* Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.396–402, 2007.

BRANDÃO, M.; LACA-BUENDÍA, J.P.; MACEDO, J.F. Árvores nativas e exóticas do estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, **EPAMIG**, 2002.

BUATONG, J., PHONGPAICHIT, S., RUKACHAISIRIKUL, V., SAKAYAROJ, J., 2011. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v27, 3005–3008, 2011.

CALDAS, L.S. *et al.* Meios nutritivos. In: TORRES, A.C. *et al.* (Eds). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. v.2, p.87-132. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1990.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.3034-3043, 1978.

CARROLL, G. Fungal Endophytes in Stems and Leaves : From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont Author(s): George Carroll Reviewed work (s): Published by : **Ecological Society of America Stable**. v.69, n.1, p.2–9, 1988.

CAVALHER-MACHADO, S. C.; ROSAS, E. C.; BRITO, F. D. A. *et al.* The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in Ige induced mice paw edema and pleurisy. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 11, p. 1552–60, 2008.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A. CONSTITUÍNTES FENÓLICOS POLARES DE *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 597–599, 2007a.

CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A. *et al.* Artigo. , v. 30, n. 3, p. 597–599, 2007b.

DAS, S. *et al.* *In vitro* propagation of cashewnut. **Plant Cell Reports**, v.15, n.6, p.615-619, 1996.

DEBERGH, P.; AITKEN-CHRISTIE, J.; COHEN, D.; GROUT, B.; VON ARNOLD, S.; ZIMMERMAN, R.; ZIV, M. Reconsideration of the term 'vitrication' as used in micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.30, p.135-140, 1992.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PARDO, M.R.M. Atividade Antimicrobiana de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**, Vol.29, n.3, p.617-622, 2005

FARIZEL, L.; GAGLIANONE, M. C. Biologia floral e fenologia reprodutiva de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) em Restinga do Norte Fluminense. **Acta Botanica Brasilica**. v.22, n.3, p. 828–833, 2008.

FERMINO, C. P. P.; NAGAO, E. O.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Estabelecimento, germinação e multiplicação *in vitro* de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Florestalis**, v.37, p.427–435, 2009.

FRANCISCO DE A.S. e SILVA. **ASSISTAT Versão 7.5 beta (2008)** - Homepage <http://www.assistat.com> DEAG-CTRN-UFCG – Atualizada 01/12/2009

GAO, X. *et al.* High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 2, p. 255–66, 2005.

GEORGE, E.F. Plant propagation by tissue culture. **Exegetic Edington**, v.1, p.1-55, 1993.

GERRITS VAN DEN ENDE AHG, HOOG GS DE. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. **Studies in Mycology** 43: 151–162, 1999.

GLIENKE, CHIRLEI; TONIAL, F.; GOMES-FIGUEIREDO, J. *et al.* Antimicrobial Activity of Endophytes from Brazilian Medicinal Plants. **Antimicrobial Agents**. p.241–254, 2012.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: SPI /Embrapa - CNPH, 1:183-260, 1998.

GOMES, R. R.; GLIENKE, C; VIDEIRA, S. I. R. *et al.* Diaporthe : a genus of endophytic , saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**, v.31, p.1–41, 2013.

GONDA, S.; KISS, A.; EMRI, T.; BATTA, G.; VASAS, G. Phytochemistry Filamentous fungi from *Plantago lanceolata* L. leaves : Contribution to the pattern and stability of bioactive metabolites. **Phytochemistry**, v.86, p.127–136, 2013.

GORZALCZANY, S.; LÓPEZ, P.; ACEVEDO, C.; FERRARO, G. Anti-inflammatory effect of *Lithrea molleoides* extracts and isolated active compounds. **Journal of ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 994–8, 2011.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa - CNPH, p. 183-260, 1998.

GUNDIDZA, M.; GWERU, N.; MAGWA, M. L.; MMBENGWA, V.; SAMIE, A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n. 24, p.7164–7169, 2009.

GUO, L.; WUJ, Z.; HAN, T.; CAO, T.; RAHMAN, K.; QINL, P..Chemical Composition, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Scapania verrucosa* Heeg. and its endophytic fungus *Chaetomium fusiforme*. **Molecules**. v.13, p.2114–2125, 2008.

GUTIERREZ, R. M. P.; GONZALEZ, A. M. N.; RAMIREZ, A. M. Compounds Derived from Endophytes : A Review of Phytochemistry and Pharmacology. **Medicinal Chemistry**, v.19, p.2992–3030, 2012.

Harborne, J.B. Phytochemical methods. **A guide to modern techniques of plant analysis**. 3th ed. London, 1998

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIES, F.T. (Eds) Plant propagation: principles and practices. 5.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1990.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. **Studies in mycology**, n. 2001, p. 9–18, 2004.

HU, Z.; LI, Y.; LU, C. *et al.* Seven Novel Linear Polyketides from *Xylaria* sp. NCY2. **Helvetica Chimica Acta**, v.93, p.925–933, 2010.

JAIN, M. K. *et al.* Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase from berries of *Schinus terebinthifolius*. v.39, n.3, 1995.

JARVIS, B. B.; MIDIWO, J. O.; BEAN, G. A.; ABOULNASR, M. B.; BARROS, C. S. The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. **Journal of Natural Products**, v.51, p.736-744, 1988.

JOHANN, S.; SÁ, N. P.; LIMA, L. A R. S. *et al.* Antifungal activity of schinol and a new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v.9, n.1, p.30, 2010.

JUAN, Y. X.; CUI, C. J.; GUO, X. C. S. Antimicrobial Activity and Biodiversity of Endophytic Fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Current Microbiology**, n.151, p.1218–1224, 2011.

KANG, M.S.; O. H, J. S.; KANG, I. C.; HONG, S. J.; CHOI, C. H. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v.46, n.6, p.744–50, 2008.

KJER, J.; WRAY, V.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PRETSCH, A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Xanalteric Acids I and II and Related Phenolic Compounds from an Endophytic *Alternaria* sp. Isolated from the Mangrove Plant *Sonneratia alba*. **Journal of Natural Products**. v.72, p.2053-2057, 2009.

KNEIFEL, W.; CZECH, E.; KOPP, B. Microbial Contamination of Medicinal Plants. **Planta Medica**, v.68, p.5–15, 2002.

KOUR, A.; SHAWL, A.S.; REHMAN, S.; SULTAN, P.; QAZI, P.H.; SUDEN, P.; KHAJURIA, R.K.; VERMA, V. Isolation and identification of an endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 24, p.1115-1121, 2008.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Perspective Chemical Ecology of Endophytic Fungi : Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v.19, p.792–798, 2012.

LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R.J.; AITKEN, K.S.; GROF, C.P.L.; BONNETT, G.D.; SMITH, G.R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. In *Vitro Cellular and Developmental Biology*. **Plant, Heidelberg**, v.41, p.345-363, 2005.

LIMA, E. D. O. *Schinus terebinthifolius* Raddi : avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**, v.16, p.83–85, 2004.

LIMA, J. S.; FIGUEIREDO, J. G.; GOMES, R. G. *et al.* Genetic Diversity of *Colletotrichum* spp. an Endophytic Fungi in a Medicinal Plant, Brazilian Pepper Tree. **Microbiology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

LIMA, J.S. **Diversidade genética e RNA de isolados de *Colletotrichum* ssp. endofíticos da planta medicinal *Schinus terebentifolius* Raddi.**

Dissertação de Mestrado do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, 2008.

LIMA, MARIA RAQUEL FERREIRA, DE; LUNA, J. DE S.; SANTOS, A. F. DOS; *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v.105, n.1, p.137–47, 2006.

LIU, XIAOLI; DONG, M.; CHEN, X. *et al.* Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX-28 and identification of its antimicrobial compound. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, p.241–247, 2008.

LLOYD, G.; McCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. **Combined Proceedings of International Plant Propagators Society**, v.30, 1980.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras – **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4ªed. Ed. Instituto Plantarum. v.1, p. 24, 2002.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p.67-73, 2000.

Manual Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (antigo NCCLS). **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**; Norma Aprovada — Sexta Edição, M7A6, v.23, n.2, 2003.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409, 1993.

MARTINES, M.J.; ALONSO, N.G.; BETANCOURT, J.B. Actividade antimicrobiana del *Schinus terebentifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s; v.1, n.3, p.37-39, 1996.

MATSUO, A. L.; FIGUEIREDO, C. R.; ARRUDA, D. C. *et al.* α -Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers antimetastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 411, n.2, p.449–54, 2011.

MAU, J. L.; LAI, E. Y. C.; WANG, N. P.; CHEN, C. C.; CHANG, C. H.; CHYAU, C. C. Composition and antioxidant activity of the essential oil from in an olfactory landscape. *Curcuma zedoaria*. **Food Chem.** v.82, p.583-591, 2003.

- MEDEIROS, C. P. C. de. **Indução in vitro de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônômicas). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.
- MEDEIROS, K. C. P.; MONTEIRO, J. C.; SILVA, B. A. *et al.* Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation : *Eucalyptus globulus* Labill , *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.23–28, 2007.
- MELO, N.F. de; OKASAKI, W.Y.; LEITA, C.B.; FÁRI, M. Estabelecimento do cultivo *in vitro* da aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras,
- MONTARROYOS, A.V.V. Contaminação in vitro. **ABCTP Notícias**, Brasília, n.36, p.5-10, 2000.
- MORTON, J. F. Brazilian Peppertree – Its Impact on People, Animals, and the environment. **Econ. Botany**, 1979.
- MOURA-COSTA, G. F.; NOCCHI, S. R.; CEOLE, L. F. *et al.* Antimicrobial activity of plants used as medicinals on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 631–8, 2012.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.437–497, 1962.
- NAIK, B.S.; SHASHIKALA, J.; KRISHNAMURTHY, Y.L. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. **Fungal Ecology**, p.89-93, 2008.
- PAIVA, A. M. S.; ALOUFA, M. A. I. Estabelecimento *in vitro* de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* Raddi) em diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, p.300–304, 2009.
- PANICKER, B.; THOMAS, P.; JANAKIRAM, T.; VENUGOPALAN, R.; NARAYANAPPA, S.B. Influence of cytokinin levels on *in vitro* propagation of shy suckering chrysanthemum “Arka Swarna” and activation of endophytic bacteria. **In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant**. v. 43, p. 614-622, 2007.
- PASQUAL, M. Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações. **Meios de cultura**. Lavras, UFLA/FAEPE. p.74, 2001.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. **Microbial Ecology of Leaves**. Springer-Verlag, p.179-197, 1991.

PIERIK, R.L.M. Produccion de plantas libres de enfermedades In: PIERIK, R.L.M. (Ed.) Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid: Ediciones Mundi-Pronsa, 1990.

PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; TERASAWA, L.V.G. ; PIMENTEL, I. C.; GLIENKE, C. . Molecular and Morphological Markers for Rapid Distinction between two *Colletotrichum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, 2009

PURI, S.C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S.; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, V.; SINGH, S. SAGAR, R.; *et al.* The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **J. Biotechnol.** v. 122, p. 494–510, 2006.

QUEIRES, L. C. S.; FAUVEL-LAFÈTVE, F.; TERRY, S. *et al.* Polyphenols purified from the Brazilian aroeira plant (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) induce apoptotic and autophagic cell death of DU145 cells. **Anticancer research**, v.26, n.1, p.379–87, 2006.

QUEIRES, L.C.S.; RODRIGUES, L.E.A. Quantificação das substâncias fenólicas totais em órgãos da aroeira *Schinus terebinthifolius* (Raddi). **Braz Arch Biol Technol**, v.41, p.247-253, 1998.

RADIC, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi — The treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v.19, p.1270–1284, 2012.

Radu, S.;Yoke K. Preliminary screening of endophytic fungi from medicinal plants in malaysia for antimicrobial and antitumor activity. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. v. 9, n. 2, p23-33, 2002.

LIMA ,R. F. L; M.; LUNA J. S, SANTOS A. F. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.137–147, 2006.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, A.; SESSITSCH, H. **Appl. Environ.Microbiol.** v.68, p.2261, 2002.

RIBAS, L. L. F.; ZANETTE, F.; KULCHETSCKI, L.; GUERRA, M. P. Micropropagação de *Aspidosperma polyneuron* (Peroba-rosa) a partir de segmentos nodais de mudas juvenis. **Revista Árvore**, v.29, p.517–524, 2005.

RIZZO, I.; VARSAVKY, E.; HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides*. **Toxicon**. v.35, n.5, p.753-757, 1997.

SABÁ, R.T. *et al.* Micropropagação do jaborandi. **Horticultura Brasileira**. v.20, n.1, p.106-9, 2002.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S.H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends Plant Sci.** v.9, p.275-280, 2004.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. FUNGAL ENDOPHYTES : A Continuum of Interactions with Host Plants. ,1998.

SANTANA, J. S.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. Isolamento e avaliação do potencial citotóxico de derivados fenólicos de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae). **Química Nova**, p. 1–4, 2012.

SARTORELLI, P.; SANTANA, JEFFERSON S.; GUADAGNIN, R. C.; LAGO, JOÃO HENRIQUE G. In vitro trypanocidal evaluation of pinane derivatives from essential oils of ripe fruits from *Schinus terebinthifolius Raddi* (Anacardiaceae). **Química Nova**, v.35, n.4, p.743–747, 2012.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, C. S.; COSTA, S. S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 563–8, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**. v.106, p.996–1004, 2002.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, n.6, p.661–686, 2005.

SIM, J. H.; KHOO, C.; LEE, L.; CHEAH, Y. Molecular Diversity of Fungal Endophytes Isolated from *Garcinia mangostana* and *Garcinia parvifolia*. **Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p.651–658, 2010.

SIRIKANTARAMAS, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. A survival strategy: thecoevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. **Phytochemistry**. v.70, p.1894–1898, 2009.

SOARES, E.L.C., MENTZ, L.A. As Espécies de *Solanum* Subgênero *Bassovia* Seção *Pachyphylla* (= *Cyphomandra* Mart. Ex Sendtn. – Solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas, Botânica**. v.57, p.231–254, 2006.

SOARES, D. G. D. S. Avaliação Clínica e Microbiológica do Tratamento da Estomatite Protética com Tintura de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira). **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.10, n.3, p.365–370, 2010.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v.58, n.9, p.1315-1324, 1995.

STOWE, B. B.; YAMAKI, T. **Annu. Rev. Plant Physiol.** v.8, p.181, 1957.

STRAPASSON, M.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S. Fungos associados às sementes de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*). **Boletim de Pesquisa Florestais**, Colombo, n.45, jul./dez. p. 131-135, 2002.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products .**Critical Review Biotechnologic.** v. 22, p. 315-333, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution** p.24, v.1596-1599, 2006.

THI, L.; NGAN, M.; MOON, J.; SHIBAMOTO, T.; AHN, Y. Growth-Inhibiting, Bactericidal, and Urease Inhibitory Effects of *Paeonia lactiflora* Root Constituents and Related Compounds on Antibiotic-Susceptible and -Resistant Strains of *Helicobacter pylori*. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9062–9073, 2012.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R. H. Micropropagation: technology and application. Dordrecht: **Kluwer Academic Press**. p. 311-336, 1991

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira)**. 141 f. Dissertação Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, 2008.

TRAPP, S. C.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S.; JARVIS, B. B. Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecenes in *Myrothecium roridum*. **Molecular and General Genetics**, v.257, n.4, p.421-432, 1998.

VASSIL, I.K.; THORPE, T.A. Plant cell, and tissue culture. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, v. 4. 593p. 1994.

VICENTE, V A; PIE, M. R.; CRUZ, L. M. *et al.* Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **STUDIES IN MYCOLOGY**, v. 61, p. 137–144, 2008.

WANG, Y.; DAI, C.-C.; ZHAO, Y.-W.; PENG, Y. Fungal endophyte-induced volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea* plantlets is mediated by nitric oxide, salicylic acid and hydrogen peroxide. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 730–735, 2012.

WANI, M.C.; TAYLOR, H.L.; WALL, M.E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A.T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.** v.93, p.2325-2327, 1971.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. Academic Press, San Diego, U.S.A 1990.

YANG, C.; CROWLEY, D.E.; MENGE, J.A. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS Microbiology Ecology*, v.35, pág. 129-136, 2001.
ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes . **Natural Product Reports**, v.23, p.753–771, 2006.

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, XINGZHONG. Epicoccins A – D , Epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-Colonizing Isolate of *Epicoccum nigrum*. , v.2, p.1522–1525, 2006.

ANEXOS

Anexo 1	71
Anexo 2	76
Anexo 3	78

Anexo 1

TABELA 1 – ISOLADOS ENDOFITICOS A PARTIR DE FRAGMENTOS FOLHARES DE *Schinus terebinthifolius*

ISOLADOS	GRUPO	ID. MORFOLÓGICA/GRUPO	ID MOLECULAR	GENE	SUBSTRATO	Origem
LBMAR 01	A	Phomopsis sp.	<i>Diaporthe</i> sp	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 02	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 03	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 04	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 05	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 06	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 07	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 08	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 09	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 10	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 11	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 12	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 13	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 14	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 15	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 16	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 17	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 18	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 19	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 20	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 21	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 22	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 23	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 24	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 25	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 26	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 27	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 28	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 29	A	<i>Phomopsis</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil

TABELA 1 – ISOLADOS ENDOFITICOS A PARTIR DE FRAGMENTOS FOLHARES DE *Schinus terebinthifolius*

ISOLADOS	GRUPO	ID. MORFOLÓGICA/GRUPO	ID MOLECULAR	GENE	SUBSTRATO	ORIGEM
LBMAR 30	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 31	A	Phomopsis sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 32	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 33	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 34	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 35	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 36	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 37	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 38	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 39	B	<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Diaporthe terebhintifolli</i>	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 40	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 41	B	<i>Diaporthe</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 42	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 43	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 44	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 45	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 46	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 47	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 48	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 49	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 50	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 51	C	<i>Acremonium</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 52	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 53	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 54	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 55	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 56	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 57	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 58	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 59	D	<i>Guignardia</i> sp.	<i>Guignardia vaccinii</i>	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil

TABELA 1 – ISOLADOS ENDOFITICOS A PARTIR DE FRAGMENTOS FOLHARES DE *Schinus terebinthifolius*

ISOLADOS	GRUPO	ID. MORFOLÓGICA/GRUPO	ID MOLECULAR	GENE	SUBSTRATO	ORIGEM
LBMAR 60	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 61	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 62	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 63	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 64	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 65	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 66	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 67	D	<i>Guignardia</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 68	E	<i>Cladosporium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 69	E	<i>Cladosporium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 70	E	<i>Cladosporium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 71	E	<i>Cladosporium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 72	E	<i>Cladosporium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 73	E	<i>Cladosporium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 74	F	<i>Glomerella</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 75	F	<i>Glomerella</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 76	G	<i>Bipolares</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 77	G	<i>Bipolares</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 78	G	<i>Bipolares</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 79	G	<i>Bipolares</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 80	H	<i>Alternaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 81	H	<i>Alternaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 82	H	<i>Alternaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 83	H	<i>Alternaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 84	H	<i>Alternaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 85	H	<i>Alternaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 86	I	<i>Pestalotiopsis</i> sp	<i>Anthostomella leucospermi</i>	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 87	I	<i>Pestalotiopsis</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 88	I	<i>Pestalotiopsis</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 89	I	<i>Pestalotiopsis</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil

TABELA 1 – ISOLADOS ENDOFITICOS A PARTIR DE FRAGMENTOS FOLHARES DE *Schinus terebinthifolius*

ISOLADOS	GRUPO	ID. MORFOLÓGICA/GRUPO	ID MOLECULAR	GENE	SUBSTRATO	ORIGEM
LBMAR 90	I	<i>Pestalotiopsis</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 91	J	<i>Fusarium</i> sp	<i>Fusarium equiseti</i>	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 92	J	<i>Fusarium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 93	J	<i>Fusarium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 94	J	<i>Fusarium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 95	J	<i>Fusarium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 96	J	<i>Fusarium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 97	J	<i>Fusarium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 98	J	<i>Fusarium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 99	K	<i>Nigrospora</i> sp	<i>Nigrospora</i> sp		Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 100	K	<i>Nigrospora</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 101	K	<i>Nigrospora</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 102	K	<i>Nigrospora</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 103	L	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 104	L	<i>Colletotrichum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 105	L	<i>Colletotrichum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 106	L	<i>Colletotrichum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 107	L	<i>Colletotrichum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 108	L	<i>Colletotrichum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 109	L	<i>Colletotrichum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 110	L	<i>Colletotrichum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 111	M	<i>Ulocladium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 112	M	<i>Ulocladium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 113	M	<i>Ulocladium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 114	M	<i>Ulocladium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 115	M	<i>Ulocladium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 116	N	<i>Penicillium</i> sp	<i>Penicillium commune</i>	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 117	N	<i>Penicillium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 118	N	<i>Penicillium</i> sp			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 119	O	<i>Xylaria</i> sp.	<i>Xylaria</i> sp.	ITS	Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil

TABELA 1 – ISOLADOS ENDOFITICOS A PARTIR DE FRAGMENTOS FOLHARES DE *Schinus terebinthifolius*

ISOLADOS	GRUPO	ID. MORFOLÓGICA/GRUPO	ID MOLECULAR	GENE	SUBSTRATO	ORIGEM
LBMAR 120	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 121	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 122	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 123	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 124	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 125	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 126	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 127	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 128	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 129	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 130	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 131	O	<i>Xylaria</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 132	P	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>		Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil
LBMAR 133	P	<i>Epicoccum</i> sp.			Folhas de <i>S. terebinthifolius</i>	Curitiba, Brasil

Anexo 2

Meios de cultura

Caldo Müller-Hinton (CMH)

Infusão de carne bovina 30,0 g

Peptona de caseína ácida 17,5 g

Amido 1,5 g

Água destilada q.s.p. 1000,0 mL

Meio Ágar Müller-Hinton (MHA)

Infusão de carne bovina 30,0 g

Peptona de caseína ácida 17,5 g

Amido 1,5 g

Ágar 17,0 g

Água destilada p/1000,0 mL

Meio Ágar Extrato de Malte (MEA) (PATERSON; BRIDGE, 1994)

Extrato de malte 20,0 g

Peptona 1,0 g

Ágar 15,0 g

Água destilada q.s.p. 1000,0 mL

pH 5,8

Meio Czapeck

Glicose 30,0g

NaNO₃ 2,0g

K₂HPO₄ 2,0g

MgSO₄.7H₂O 0,5g

KCl 0,5g

FeSO₄ 0,5g 74

Água destilada. 1000,0mL pH 8,5

Meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

Batata descascada e cortada 200,0 g

Dextrose 20,0 g

Ágar 15,0 g

Água destilada p/1000,0 mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 20 minutos.

Filtrou-se com gaze, adicionou-se a dextrose ao caldo e completou-se com água destilada em quantidade suficiente para 1000,0mL.

O pH foi ajustado para 6,8 adicionando-se NaOH 1N e/ou HCl 1N conforme a necessidade.

Meio Seletivo para Isolamento de Actinomicetos (AC) (KÜSTER;

WILLIAMS, 1964)

Amido (ou glicerol) 10,0g

Caseína 0,3g

KNO₃ 2,0g

NaCl 2,0g

K₂HPO₄ 2,0g

MgSO₄.7H₂O 0,05 g

FeSO₄.7H₂O 0,01g

Ágar 18,0g

Água destilada q.s.p. 1000,0mL

pH 7,0-7,2

Após a esterilização do meio, antes do plaqueamento, a uma temperatura de aproximadamente 50°C, foram acrescentados 50µg/mL de ciclohexamida ao meio.

OBS: Todos os meios de cultura foram autoclavados durante 20 minutos a 120°C e 1atm e armazenados em temperatura ambiente ou em geladeira.

ANEXO 3

Análise estatística atividade antimicrobiana extratos de *Schinus terebinthifolius*

=====

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2013) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.01/03/2013

=====

=====

Arquivo estatistica diametro Data 27/03/2013 Hora 14:00:32

EXPERIMENTO FATORIAL

QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F

Fator1(F1)	3	258.06250	86.02083	50.9753 **
Fator2(F2)	7	6616.18750	945.16964	560.1005 **
Int. F1xF2	21	586.18750	27.91369	16.5414 **

Tratamentos	31	7460.43750	240.65927	142.6129 **
Resíduo	32	54.00000	1.68750	

Total 63 7514.43750

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

GL	GLR	F-crit	F	p
3	32	4.4604	50.9753	<0.001
7	32	3.2593	560.1005	<0.001
21	32	2.4809	16.5415	<0.001
31	32	2.3291	142.6129	<0.001

Fator 1 = Fator1

Fator 2 = Fator2

MÉDIAS E MEDIDAS

Médias do fator 1

1	14.62500	b
2	16.68750	a
3	11.37500	d
4	12.68750	c

dms = 1.24302

Médias do fator 2

1	19.12500	b
2	0.00000	e
3	0.00000	e
4	4.62500	d
5	26.12500	a
6	14.87500	c
7	25.37500	a
8	20.62500	b

dms = 2.10350

MÉDIAS DE INTERAÇÃO

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

	B				
A	<hr/>				
	B1	B2	B3	B4	B5
A1	22.5000 aAB	0.0000 aD	0.0000 aD	11.0000 aC	26.0000 bA

A2	16.5000 bD	0.0000 aF	0.0000 aF	7.5000 aE	38.5000 aA
A3	16.5000 bBC	0.0000 aD	0.0000 aD	0.0000 bD	20.0000 cAB
A4	21.0000 aAB	0.0000 aD	0.0000 aD	0.0000 bD	20.0000 cB

Continuação

Fator 1 x Fator 2 (AxB)

	B		
A	<hr/>		
	B6	B7	B8

A1	13.0000 bC	23.5000 bAB	21.0000 abB
A2	20.0000 aCD	29.5000 aB	21.5000 aC
A3	13.5000 bC	23.5000 bA	17.5000 bBC
A4	13.0000 bC	25.0000 bA	22.5000 aAB

dms para colunas = 3.5158 dms para linhas = 4.2070

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem

estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste

de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

$MG = 13.84375$ $CV\% = 9.38$

Ponto médio = 19.50000

DADOS

20 25

0 0

0 0

10 12

25 27

14 12

23 24

20 22

17 16

0 0

0 0

8 7

38 39

22 18

29 30

20 23

17 16

0 0

0 0

0 0

20 20

15 12

23 24

17 18

20 22

0 0

0 0

0 0

19 21

12 14

24 26

21 24

SIGLAS E ABREVIATÖES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande

CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components

Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD

CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA:
American

Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of

The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS

ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando:
American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006.

p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa

computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista

Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1,

p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance.

In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE,
6,

Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural

Engineers, 1996. p.294-298.